

**Untersuchungen zu Sequenzvarianten im p12-Gen
beim hereditären Pankreaskarzinom**

Inaugural-Dissertation

von

Sonja Freyermuth

Aus dem Medizinischem Zentrum für Humangenetik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Grzeschik

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Untersuchungen zu Sequenzvarianten im p12-Gen beim hereditären Pankreaskarzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Sonja Freyermuth aus Frankfurt am Main
Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
Am 26.02.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: Prof. Dr. Harald Rieder
Korreferent: PD Dr. Volker Ellenrieder

Für Maria und Gerhard Freyermuth

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1. Einführung in die Tumorgenetik	3
1.2. Das Pankreaskarzinom	5
1.3. Epidemiologie	8
1.4. Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms	9
1.4.1. Umweltbedingte Risikofaktoren	9
1.4.2. Wirtsfaktoren	10
1.4.3. Tumorprädispositionssyndrome	11
1.4.3.1. Hereditäre Pankreatitis	11
1.4.3.2. Peutz-Jeghers Syndrom (PJS)	12
1.4.3.3. Das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom	12
1.4.3.4. FAMMM (Familial Atypical Multiple-Mole-Melanoma)	13
1.5. Der CDKN2A-Genlocus	20
1.6. Mutationen des p16 ^{INK4A} -Gens	26
1.7. Fragestellung	27
2. Material und Methoden	29
2.1. Die nationale Fallsammlung für familiäres Pankreaskarzinom	29
2.1.1. Ziele der FaPaCa-Fallsammlung	30
2.1.2. Einschlusskriterien	30
2.1.3. Ausschlusskriterien	30
2.1.4. Bisherige Ergebnisse	31
2.2. Material	33
2.2.1. Patienten und Kontrollen	33
2.2.2. KITS	35
2.2.3. Synthetische Oligonukleotide	35
2.2.4. Enzyme	35
2.2.5. Enzympuffer	35
2.2.6. Größenmarker	36

2.2.7. Auftragspuffer.....	36
2.2.8. Chemikalien.....	36
2.2.9. Geräte.....	37
2.2.10. Software.....	38
2.3. Methoden.....	39
2.3.1. Isolierung von genomischer DNA aus humanem Vollblut.....	39
2.3.2. Konzentrationsbestimmung von DNA.....	39
2.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	40
2.3.4. Agarosegelelektrophorese.....	41
2.3.4.1. Qualitativ.....	41
2.3.4.2. Quantitativ.....	41
2.3.5. Aufreinigung der PCR-Produkte.....	42
2.3.6. Sequenzierung.....	42
2.3.6.1. Sequenz-PCR.....	43
2.3.6.2. Aufreinigung der Sequenzprodukte.....	44
2.3.6.3. Gel mit ABI 377.....	44
2.3.6.4. Ablesen der Nukleotidsequenz.....	45
 3. Ergebnisse.....	 46
3.1. Polymorphismussuche im p12-Gen.....	46
3.1.1. PCR-Analyse.....	46
3.1.2. Sequenzanalyse.....	47
3.2. Mutationsanalyse des p12-Gens.....	48
3.2.1. PCR-Analyse.....	48
3.2.2. Sequenzanalyse.....	49
3.3. Klinische Charakteristika der Familien versus Indexpatienten.....	50
3.3.1. Familiäres Pankreaskarzinom.....	50
3.3.2. Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom.....	51
3.3.3. Familial Atypical Multiple-Mole-Melanoma-Syndrom.....	51
3.3.4. Indexpatient mit der Mutation Q50X.....	52

4. Diskussion	53
4.1. Die alternative Splicevariante des CDKN2A-Genlocus: p12	53
4.2. Die nonsense Mutation Q50X im p12-Gen	56
4.2.1. Lokalisation der Mutation Q50X	56
4.2.2. Bedeutung der Mutation Q50X im p12-Gen	57
4.2.3. Fehlende Bedeutung von p12-Mutationen beim familiären Pankreaskarzinom	59
4.2.4. p12-Mutation und ihre Bedeutung für die Zukunft	59
4.3. Hochrisikopatienten und genetische Beratung	60
4.4. Früherkennungsprogramm	61
 5. Literaturverzeichnis	 63
 6. Lebenslauf	
 7. Verzeichnis der akademischen Lehrer	
 8. Danksagung	
 9. Ehrenwörtliche Erklärung	

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AKT 2	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 2
ARF	Alternative reading frame
AT	Ataxia teleangiectatica
BRCA 1/2	Breast Cancer - Gene 1/2
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDKN2A	Cyclin dependent Kinase 2A
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DPC 4	Deleted in Pancreatic Carcinoma locus 4
EA	Eigenanamnese
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EUROPAC	European Registry of Hereditary Pancreatitis and Familial Pancreatic Cancer
ex	Exon
FAMMM	Familial Atypical Multiple Mole Melanoma - Syndrom
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FPC	Familiäres Pankreaskarzinom
g	Gramm
HNPPC	Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom
H ₂ O	Wasser
HP	Hereditäre Pankreatitis
HPLC	High performance liquid chromatographie
ID	Identifikationsnummer
i.d.R.	in der Regel
Kb	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
K-RAS	Kirsten-Ras-Onkogene-Associated Gene

MDM	Murine Double Minute
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
MM	Malignes Melanom
MN	Multiple Naevi
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MSH 2	Homolog of the E. coli MutS Gene
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPK	Nasopharynxkarzinom
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasia
PC	Pankreaskarzinom
PKMS	Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PJS	Peutz-Jeghers Syndrom
pRb	Retinoblastom Protein
PRSS 1	Protease Serine 1
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion
sek.	Sekunde (n)
SMAD 4	Mothers Against Decapentaplegic
STK 11	Serin/Threonin-Kinase 11
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TGF	Transforming Growth Factor
Tmp	Temperatur
TP53	Tumor Protein 53
UV	Ultraviolet
XPB	Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group B
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Unter allen Karzinomen rangiert das Pankreaskarzinom in Deutschland bei Männern an fünfter und bei Frauen an sechster Position.

Die schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 4% resultiert aus einer meist späten Diagnose der Erkrankung mit oft schon bestehenden Metastasen und begrenzten Therapiemöglichkeiten.

Das Pankreaskarzinom tritt zum größten Teil sporadisch auf. Jedoch erkranken etwa 3 bis 5% der Pankreaskarzinompatienten mit familiärer Häufung. Es tritt entweder isoliert auf (= familiäres Pankreaskarzinom) oder ist mit so genannten Tumorprädispositionssyndromen assoziiert. Im Gegensatz zu den Tumorprädispositionssyndromen, bei denen Pankreaskarzinome mit den unterschiedlichsten Karzinomen kombiniert auftreten, konnte für das familiäre Pankreaskarzinom bislang keine krankheitsauslösende Mutation und damit eine Genlokalisierung identifiziert werden. Eines dieser Tumorprädispositionssyndrome ist das Familial atypical multiple mole melanoma-Syndrom (FAMMM-Syndrom). Verschiedene Mutationen im CDKN2A-Gen (Cyclin dependent kinase 2A) auf dem menschlichen Chromosomenabschnitt 9p21 sind für dieses Tumorsyndrom verantwortlich.

Ziel dieser Arbeit war daher, eine 1999 entdeckte alternative Splicevariante des CDKN2A-Genlocus, die ausschließlich in humanen Pankreaszellen exprimiert wird, einerseits auf Mutationen zu untersuchen, die ursächlich für ein familiäres Pankreaskarzinom sein könnten, und andererseits weitere Mutationen zu finden, die Ursache für andere Tumorprädispositionssyndrome sein könnten.

Es wurde die genomische DNA von 25 Patienten auf konstitutionelle Mutationen untersucht, die im Rahmen der Deutschen Fallsammlung für familiäres Pankreaskarzinom bereits rekrutiert wurden.

Die Ergebnisse aus den Sequenzanalysen zeigten bei einem der 25 untersuchten Indexpatienten in der Gruppe des Pankreaskarzinom-Melanom-Syndroms die nonsense Mutation c.148 C>T (Q50X). Die weiteren 24 untersuchten Patienten zeigten keine Mutationen in der alternativen Splicevariante p12 des CDKN2A-Gens.

Bei den untersuchten Mitgliedern der hereditären Pankreassyndrom-Familien konnte in der pankreas-spezifischen Splicevariante p12 des CDKN2A-Gens keine Mutation nachgewiesen werden und damit nicht den Verdacht bestätigen, dass Mutationen in

einem pankreas-spezifisch exprimierten Gen zur Entstehung von Tumoren beitragen können.

Da bisher keine Screening-Untersuchungen an großen Patientengruppen durchgeführt wurden, war ein weiteres Ziel an 42 Probanden, die in keiner Weise einer der Tumordispositions-Syndrom-Gruppen angehören, eine Untersuchung auf Polymorphismen durchzuführen. Es zeigte sich bei keiner Person eine Veränderung der untersuchten Gensequenz.

Die genetischen Untersuchungen des hereditären Pankreaskarzinoms werden durch die relativ niedrigen Fallzahlen beschränkt. Durch die Erforschung des Krankheitsverlaufs, der Pathomechanismen inklusive genetischen Veränderungen von Pankreaskarzinompatienten können Hochrisikopatienten in Früherkennungsprogramme aufgenommen und in frühen Tumorstadien bzw. Vorläuferstadien einer chirurgischen Therapie zugeführt werden, die derzeit die einzig potentiell kurative Maßnahme darstellt. Weiterhin wäre durch die Identifizierung von Gendefekten des Pankreaskarzinoms ein Pankreaskarzinomscreeningprogramm denkbar. Forschungsergebnisse von Vorläuferläsionen und genetischen Mechanismen einer hereditären Tumorerkrankung geben sehr oft auch Aufschluss über das sporadische Karzinom.

Aus allen diesen Gründen sind auch in Zukunft weitere Untersuchungen von Pankreaskarzinompatienten und deren Angehörigen in kontrollierten Studien- und Fallsammlungen dringend notwendig.

1. Einleitung

1.1. Einführung in die Tumorgenetik

„Im Jahre 1902 habe ich ... die Vermutung angeknüpft, dass maligne Tumoren die Folge eines gewissen abnormen Chromosomenbestandes sein könnten ... die Zelle des malignen Tumors ist eine in bestimmter Hinsicht defekte Zelle; sie hat die Eigenschaften der normalen Gewebezelle verloren ... Die Tumorzelle, der gewisse Chromosomen fehlen, während sie andere im Übermaß besitzt, wird manche Stoffe im Überschuss produzieren und andere in ungenügender Menge oder gar nicht ... Experimente ... haben zu dem Ergebnis geführt, dass die meisten von der Norm abweichenden Chromosomenkombinationen zum Tod der Zelle führen, dass jedoch auch Kombinationen vorkommen, bei denen die Zelle lebensfähig bleibt, aber nicht mehr in typischer Weise funktioniert ...“.

Theodor Boveri, 1914

Die Vorstellung genetisch bedingter Ursachen von Tumorerkrankungen aufgrund epidemiologischer, zytogenetischer sowie familiärer Untersuchungen reicht annähernd hundert Jahre zurück (Witkowski, 1990). Aber erst in den sechziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts gelang dieser Nachweis mit der bahnbrechenden Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms bei der chronisch-myeloischen Leukämie durch Nowell und Hungerford (Nowell *et al.*, 1960). Jedoch unterscheiden sich Tumorerkrankungen von anderen genetischen Krankheiten, indem sie nicht wie diese auf Keimbahnmutationen, sondern i.d.R. auf somatischen Mutationen beruhen. Mit ihrer „multiple-hit“-Theorie waren Vogelstein und Kinzler maßgeblich an der Entwicklung einer Hypothese zur Tumorentstehung beteiligt. Demnach geht die Tumorentstehung von einer Zelle aus und basiert auf einer Akkumulation mehrerer unabhängiger Mutationen (Vogelstein und Kinzler, 1993). Dieses sogenannte Mehrschrittkonzept wurde erstmals 1971 für das 2-Schritt-Modell des Retinoblastoms von Alfred Knudson formuliert: Die erste Mutation wird über die Keimbahn vererbt, die 2. Mutation im anderen Allel findet in der Targetzelle, dem Retinoblasten statt (Knudson, 1971).

Im normalen adulten, sich ständig erneuernden Gewebe, besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilung und Zelluntergang durch programmierten Zelltod (Apoptose) (Kerr *et al.*, 1972; Meier *et al.*, 2000; Evan und Vousden, 2001). Dieses Phänomen wird durch die den Zellzyklus regulierenden Gene gewährleistet (Krammer *et al.*, 1994). Ist die Kontrolle des Zellzyklus aufgrund mutierter Regulationsgene gestört, entsteht ein zunehmendes Ungleichgewicht zwischen wachstumshemmenden und -stimulierenden Signalen. Viele der an diesem Vorgang beteiligten komplexen Prozesse sind noch ungeklärt.

Die bisher lokalisierten und isolierten Gene, die in mutierter Form zu einer Initiation und Progression menschlicher Tumore beitragen, werden in drei Gruppen unterteilt: Onkogene, Tumorsuppressorgene und Reparatur-Mutator-Gene (Levine, 1995).

Die Tumorsuppressorgene und Protoonkogene kann man aufgrund ihrer Wirkungsweisen auf das Proliferationsverhalten von Zellen zu der Gruppe der „Gatekeeper“- (englisch: Pfortner/Torwächter) Gene zählen. Als „Gatekeeper“ werden Gene bezeichnet, die für die Aufrechterhaltung einer konstanten Zellzahl in Geweben verantwortlich sind (Kinzler und Vogelstein, 1997). Dabei kodieren Protoonkogene Proteine, die in der gesunden Zelle an der Wachstumskontrolle beteiligt sind, wie z. B. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, intrazelluläre Signalüberträger oder Transkriptionsfaktoren. Eine Mutation in diesen Genen kann zu einer unkontrollierten Aktivierung und damit zur Zelltransformation und Tumorentstehung führen (Weinberg, 1989). Tumorsuppressorgenprodukte sind dagegen eine Gruppe von Genen, die an den wichtigsten Schlüsselstellen der zellulären Signaltransduktionswege für Proliferation, Differenzierung der Zelle, Apoptose und genetischer Integrität sitzen. Sie hemmen normalerweise das Zellwachstum. Durch eine inaktivierende Mutation oder den vollständigen Verlust eines solchen Gens können diese Funktionen nicht mehr ausgeübt werden. Sie definieren sich somit als Gene, die durch die „loss-of-function“ (englisch: Funktionsverlust) Mutationen zur Entwicklung von Tumoren beitragen (Weinberg, 1991; Fearon und Vogelstein, 1993; Klein, 1993; Coleman und Tsongalis, 1995; Sidransky, 1996; Haber und Harlow, 1997).

Untersuchungen zur Tumorentstehung in den vergangenen Jahren führten zu der Erkenntnis, dass es noch eine zweite Gruppe von „cancer-susceptibility“- (englisch: Krebs-empfindlich) Genen gibt, die das Verständnis über die Tumorentstehung und damit die Funktion von Tumorsuppressorgen verändert hat (Kinzler und Vogelstein, 1997). Diese neue Klasse von Tumorsuppressorgen ist für die Aufrechterhaltung der

Integrität des Genoms verantwortlich und wird daher als „Caretaker“ (englisch: Wärter) bezeichnet. Die Inaktivierung eines „Caretaker“-Genes führt zu einer genetischen Instabilität, die in einer erhöhten Mutationsrate aller Gene inklusive der „Gatekeeper“-Gene resultiert. Ein Defekt in einem „Caretaker“-Gen kann somit einen Tumor verursachen. Für die Initiation der Tumorentwicklung sind sie aber nicht notwendig.

Menschen mit einer vererbten Mutation in einem „Caretaker“-Gen werden im Laufe ihres Lebens nur an einem Tumor erkranken, wenn sie weitere somatische Mutationen erwerben. Zur Tumorentstehung kommt es, wenn eine Mutation in einem weiteren „Caretaker“-Gen und Mutationen auf beiden Allelen von einem „Gatekeeper“-Gen vorliegen. Die zurzeit bekannten „Caretaker“-Gene kodieren für DNA-Reparatur-Proteine wie zum Beispiel: XPB, MSH2, BRCA1 und BRCA2.

1.2. Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist ein maligner Tumor, der histomorphologisch in drei Gruppen eingeteilt wird. In der ersten Gruppe überwiegen die vom Gangepithel des exokrinen Pankreas ausgehenden tubulären Adenokarzinome mit etwa 85% aller Pankreaskarzinome, während pleomorphe duktale Karzinome 5 bis 9% und duktal zystische Adenome/Adenokarzinome etwa 1 bis 3% ausmachen. Selten werden azinäre Karzinome (zweite Gruppe) mit unter 1% und Karzinome unklarer Histogenese (dritte Gruppe) mit 1 bis 3% diagnostiziert (Tumor Zentrum Berlin e.V., 2002).

Am häufigsten sind die Tumore im Pankreaskopf lokalisiert (ca. 70%), im Corpus- (ca. 20%) und wesentlich seltener im Caudabereich (ca. 10%). Die Metastasierung erfolgt meist sehr früh in die regionären Lymphknoten und das Peritoneum, sowie hämatogen in Lunge und Leber (Tumorzentrum München, 1998).

Man unterscheidet zwei Arten von Pankreaskarzinomen: das sporadische und das familiär gehäuft auftretende Pankreaskarzinom. 1973 konnte erstmals eine familiäre Häufung von Pankreaskarzinomen bei 4 von 6 Geschwistern nachgewiesen werden (Mc Dermott und Kramer, 1973). Es folgten weitere Fallberichte, die das familiäre Aufkommen bestätigten (Friedman und Fialkow, 1974; Reimer *et al.*, 1977; Danes und Lynch, 1982; Dat und Sontag, 1982; Grajower, 1983; Kathkouda und Moviel, 1986; Ehrenthal *et al.*, 1987; Lynch *et al.*, 1990; Lynch *et al.*, 1992). In der bislang größten

untersuchten Familie waren 9 von 50 Familienangehörigen in 4 Generationen an einem histologisch gesicherten, duktalem Pankreaskarzinom verstorben (Evans *et al.*, 1995). Die bekannteste Familie mit einem möglicherweise vererbten Pankreaskarzinom ist die des ehemaligen US-Präsidenten Jimmy Carter (New York Times, 1989).

Aufgrund der bisher vorliegenden Literatur wird eine hereditäre Ursache des Pankreaskarzinoms auf etwa 3 bis 5% aller Pankreaskarzinome geschätzt. Es tritt entweder isoliert auf (= familiäres Pankreaskarzinom) oder ist mit so genannten Tumorprädispositionssyndromen assoziiert (Lynch, 1994; Bartsch *et al.*, 2004).

Definitionsgemäß liegt ein familiäres Pankreaskarzinom vor, wenn mindestens zwei erstgradig Verwandte oder mindestens drei erst- oder zweitgradig Verwandte, von denen einer unter 50 Jahre alt ist, an einem histologisch gesicherten duktalem Pankreaskarzinom erkranken (Bartsch und Rothmund, 2001). Das Transmissionsmuster entspricht in den meisten untersuchten Familien einem autosomal-dominantem Erbgang (Lynch *et al.*, 1996; Banke *et al.*, 1997), wobei Penetranz und Expressivität noch nicht ausreichend validiert sind. Der zugrunde liegende Gendefekt des familiären Pankreaskarzinoms ist bis heute unbekannt (Lynch *et al.*, 2004). Bezüglich des Erkrankungsalters, der Geschlechtsverteilung, der Histopathologie und der Überlebenszeit konnten bis dato keine signifikanten Unterschiede zum sporadisch auftretenden Pankreaskarzinom festgestellt werden (Lynch *et al.*, 1990; Lynch *et al.*, 1992; Lynch *et al.*, 1995; Hruban *et al.*, 1998). Ein zu beachtender Unterschied zum sporadischen Pankreaskarzinom sind multifokale Hyperplasien und Dysplasien, häufig auch multizentrische Karzinome, die sich in nahezu allen Pankreata von Patienten mit familiärem Pankreaskarzinom fanden (Ehrenthal *et al.*, 1987; DiGuiseppe *et al.*, 1994; Bretnall *et al.*, 1999). Das Vorhandensein multipler Neubildungen im gleichen Organ ist charakteristisch für viele hereditäre Tumorsyndrome und folglich auch ein Indiz für eine genetische Prädisposition (Bartsch und Rothmund, 2001).

Zu den familiären Tumorsyndromen, die zur Entwicklung eines exokrinen Pankreaskarzinom prädisponieren, gehören in erster Linie die hereditäre Pankreatitis (Comfort und Steinberg, 1952), das familial atypical multiple mole melanoma-Syndrom (FAMMM) (Bartsch *et al.*, 1995; Gruis *et al.*, 1995) und das Peutz-Jeghers-Syndrom (Giardello *et al.*, 1987). Das kumulative Lebenszeitrisko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, liegt bei der hereditären Pankreatitis bei bis zu 40%, beim FAMMM-Syndrom bei bis zu 75%, beim Peutz-Jeghers-Syndrom bei ca. 12% und beim hereditären Brustkrebs bei 3 bis 10% (Bartsch *et al.*, 2001). Patienten mit

hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinom (Lynch *et al.*, 1993), Li-Fraumeni-Syndrom (Li und Fraumeni, 1969), Gardner-Syndrom (Offerhaus *et al.*, 1992) und Ataxia teleangiectatica (Mc Kusick, 1990) tragen ein Risiko von 5% oder weniger, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln.

Das Pankreaskarzinom kann einhergehen mit einer sequenziellen Akquisition somatischer Mutationen in dem Protoonkogen Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog (K-RAS) (Almoguera *et al.*, 1988) und den Tumorsuppressorgenen Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) (Hussussian *et al.*, 1994), Tumor protein p53 (TP53) (Malkin *et al.*, 1990; Srivastava *et al.*, 1990) und deleted in pancreatic carcinoma locus 4 (DPC4/SMAD4) (Hahn *et al.*, 1996). Des weiteren können Amplifikationen im Protoonkogen v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2 (AKT2), der Verlust der Tumorsuppressorgene Breast cancer 2 (BRCA2) (Wooster *et al.*, 1995) und Serin/Threonin Kinase 11 (LKP1/STK11) (Jenne *et al.*, 1998), sowie Defekte in Mismatch-Reparaturgenen Auslöser sein (Schneider *et al.*, 2003). Vergleichbar mit der Dysplasie-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms entwickelt sich das Pankreasepithel über eine Epithelhyperplasie (PanIN-1A) und eine papilläre Hyperplasie ohne oder mit Atypien (PanIN-1B oder PanIN-2) zu einem „Carcinoma in situ“ (PanIN-3), das schließlich in ein invasives Pankreaskarzinom übergeht (Abb. 1) (Hruban *et al.*, 2001).

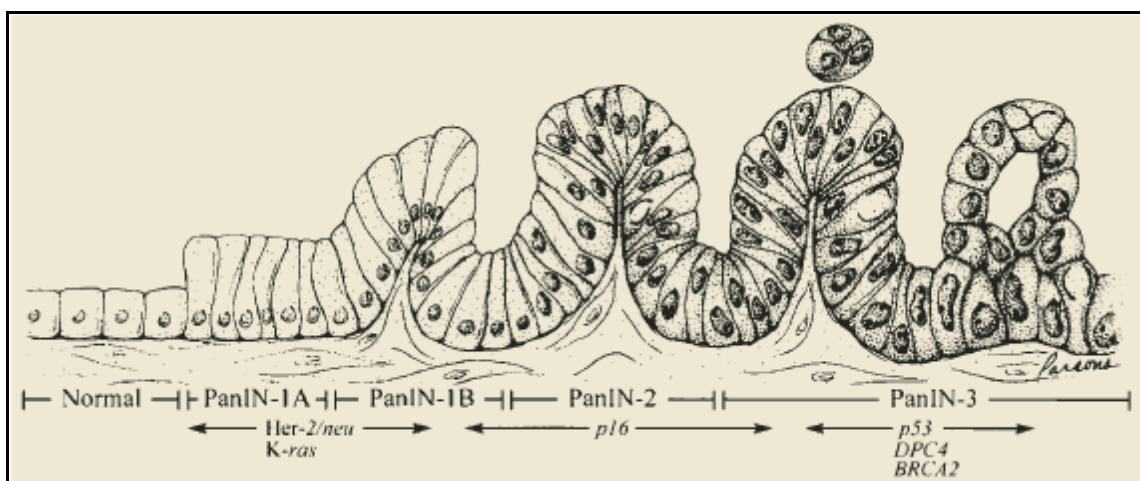


Abbildung 1: Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms (Hruban *et al.*, 2000).

Die genetischen Veränderungen korrelieren in unterschiedlichen Stadien und im Ausmaß mit der morphologischen Progression (Hruban *et al.*, 2000). Häufig vorkommend sind aktivierende Punktmutationen im K-RAS-Gen mit bis zu 30% in frühen PanIN-Läsionen und über 90% im duktalem Karzinom (Almoguera *et al.*, 1988; Hruban *et al.*, 1993; Terhune *et al.*, 1998; Apple *et al.*, 1999). Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgenlocus CDKN2A folgt mit 80 bis 95% in den intraepithelialen Läsionen (PanIN2) (Caldas *et al.*, 1994; Rozenblum *et al.*, 1997). Eine Inaktivierung des p53-Gens liegt in mehr als 60% der späteren Stadien des Tumorprogressionsmodells (PanIN2 und PanIN3) vor (Barton *et al.*, 1991; Boschmann *et al.*, 1994; Apple *et al.*, 1999) und ein Verlust der SMAD4-Expression in bis zu 30% der höhergradigen Läsionen (Wilentz *et al.*, 2000).

1.3. Epidemiologie

Bei Diagnosestellung eines Pankreaskarzinoms ist die Erkrankung nur in etwa einem Drittel der Fälle kurativ durch Resektion behandelbar, wobei in 80% der Fälle bereits größere Tumore und Lymphknotenmetastasen vorliegen (Gebhardt *et al.*, 2000, Magistrelli *et al.*, 2000; Wenger *et al.*, 2000).

Die mediane Überlebenszeit beträgt unter der konventionellen palliativen Standardtherapie vier bis sechs Monate und die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 4% (Coopermann, 2001). Letztere kann bei kleinen, lokal begrenzten Tumoren ohne Lymphknotenbefall und Fernmetastasen auch auf bis zu 40% ansteigen (Yeo und Cameron, 1998).

Mit geschätzten 13.400 Neuerkrankungen pro Jahr in der Bundesrepublik Deutschland nimmt das duktales Pankreasadenokarzinom bei Männern den neunten Platz und bei Frauen den siebten Platz in der Statistik der häufigsten Krebsneuerkrankungen ein (Robert-Koch-Institut, 2000; Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2005). Unter allen Karzinomen stellt es bei Männern das fünft- und bei Frauen das sechsthäufigste Karzinom dar (Onkodin, 2002).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 75, für Männer bei über 68 Jahren (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2000).

In Deutschland rangierte das Pankreaskarzinom mit 12.100 Todesfällen im Jahr 2000 an sechster Stelle, das bedeutet etwa 6% aller Krebstodesfälle. In den USA nimmt das Pankreaskarzinom mit 30.000 Fällen pro Jahr Rang fünf der häufigsten Todesursachen unter den Tumorerkrankungen ein (Jemal *et al.*, 2003; Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2005).

Die Gründe für die hohe Mortalitätsrate, deren Ausmaß annähernd so hoch ist wie die Inzidenzrate des Pankreaskarzinoms, sind vielfältig. Einerseits treten erste Symptome spät auf, wodurch bei Diagnosestellung ein meist fortgeschrittenes Stadium des Tumors besteht. Andererseits ist die Therapierbarkeit des Pankreaskarzinoms aufgrund der anatomisch schwierigen Zugänglichkeit und durch ein mangelhaftes Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie eingeschränkt. (Rieder *et al.*, 2002).

1.4. Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms

1.4.1. Umweltbedingte Risikofaktoren

Den bisher einzigen gesicherten umweltbedingten Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms stellt das Rauchen dar (Chappuis *et al.*, 2001). Das Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, ist bei Rauchern etwa um das 2 bis 5-Fache erhöht und zeigt eine positive Korrelation mit steigender Anzahl gerauchter Zigaretten (Ghadirian *et al.*, 1991). Zusätzlich konnten Rulyak *et al.* (2003) in einer Fall-Kontroll-Studie zeigen, dass das Risiko bei Männern und bei Probanden, die jünger als 50 Jahre alt sind, nochmals ansteigt. Raucher entwickeln im Gegensatz zu Nichtrauchern durchschnittlich eine Dekade früher ein Pankreaskarzinom (59.6 Jahre vs. 69.1 Jahre). Inwieweit eine ungesunde Ernährung mit hohem Fleisch- und Fettanteil und geringem Gemüseanteil einen negativen Einfluss hat, evaluierten diverse Studien. Trotz fehlender Beweise, lieferten sie Hinweise auf ein erhöhtes Pankreaskarzinomrisiko (Ishii *et al.*, 1968; Norell *et al.*, 1986; Mack *et al.*, 1986). Norell *et al.* untersuchten im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie den Zusammenhang zwischen vermehrtem Konsum von gebratenem und gegrilltem Fleisch und Pankreaskarzinomen. Das relative Risiko bei fast täglichem Verzehr von Grillfleisch betrug 13.4 (90% Confidence interval=2.4-74.7) im Vergleich

zu einem relativen Risiko von 0.5 (90% Confidence interval=0.3-0.9) bei fast täglichem Konsum von Zitrusfrüchten (Norell *et al.*, 1986). Anderen umweltbedingten Risikofaktoren, wie Alkoholkonsum, Kaffeekonsum, usw. konnte bis heute kein signifikanter Einfluss auf die Krankheitsentstehung nachgewiesen werden (Jick und Dinan, 1981; Mack *et al.*, 1986; Falk *et al.*, 1988; Ghadirian *et al.*, 1991; Bueno de Mesquita *et al.*, 1992; Friedman und van den Eden, 1993).

Das umweltbedingte Risikoprofil des sporadischen Pankreaskarzinoms zeigt keine wesentlichen Unterschiede zum familiären Pankreaskarzinom (Ghadirian *et al.*, 1991).

1.4.2. Wirtsfaktoren

Eine kausale Beziehung zwischen Wirtsfaktoren, wie z.B. chronische Pankreatitis, Magen- oder Gallenoperationen, konnte in verschiedenen Studien aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse nicht nachgewiesen werden (Hyvarinen und Partanen, 1987; Offerhaus *et al.*, 1987; Maringhini *et al.*, 1987; Ghadirian *et al.*, 1991; Lowenfels *et al.*, 1993; Gullo *et al.*, 1994; Everhart und Wright, 1995; Silverman *et al.*, 1999).

Im Falle des Diabetes mellitus existieren jedoch mehrere Studien, die auf ein erhöhtes Risiko deuten, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln. So zeigten u. a. die Fall-Kontroll- und Kohortenstudien von Everhart und Wright (1995) und die Follow-up-Studien von Wideroff *et al.* (1997), dass Patienten mit Diabetes mellitus ein relatives Risiko von 2,1 für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms aufweisen. Patienten mit einem 10 Jahre oder länger bekannten Diabetes mellitus haben ein Risiko von 50%, während Patienten mit einer nur einjährigen Krankheitsdauer ein 30%iges Risiko aufweisen (Silverman *et al.*, 1999). Andere Arbeitsgruppen konnten wiederum kein signifikant erhöhtes Pankreaskarzinomrisiko bei Diabetikern nachweisen. Besonders hervorzuheben ist die Studie von Ghadirian *et al.* (1991) mit 14 Pankreaskarzinomfamilien, in der keiner von einem Diabetes mellitus betroffen war.

1.4.3. Tumorprädispositionssyndrome

Das familiäre Pankreaskarzinom tritt in den betroffenen Familien entweder isoliert auf (familiäres Pankreaskarzinom) oder ist mit bekannten Tumorprädispositionssyndromen assoziiert. Diese gehen mit einem unterschiedlich erhöhten Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken einher. Dazu gehören die hereditäre Pankreatitis, das Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS), das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom, das familial atypical multiple mole melanoma Syndrom (FAMMM-Syndrom), das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPCC-LynchII), das Li-Fraumeni-Syndrom, die familiäre adenomatöse Polyposis (Gardner-Syndrom) und die Ataxia teleangiectatica (AT).

Im Gegensatz zum familiären Pankreaskarzinom, dessen genetische Ursache bislang noch nicht geklärt werden konnte, sind bestimmte Mutationen für die einzelnen Tumorprädispositionssyndrome bereits bekannt.

1.4.3.1. Hereditäre Pankreatitis

Die hereditäre Pankreatitis (HP) ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte Krankheit mit einer Penetranz von ungefähr 80%. Klinisch zeigt sich ein früher Beginn akuter rezidivierender Pankreatitiden, die in eine chronische Pankreatitis übergehen. In ca. 70% der Fälle ist das kationische Trypsinogen-Gen (Protease Serin 1, PRSS1) von einer Mutation betroffen (Tabelle 1). Für die restlichen 30% der HP-Fälle konnten noch keine Gene bzw. Mutationen verantwortlich gemacht werden (Whitcomb *et al.*, 1996; Gorry *et al.*, 1997). Die Mutation im PRSS1-Gen blockiert die Inaktivierung von Trypsin und bewirkt dadurch eine Autodigestion des Pankreas, woraus eine schwere Pankreatitis resultiert. Die HP geht mit einem kumulativen Lebenszeitrisiko für die Entwicklung eines dukalen Pankreaskarzinoms bis zum 70. Lebensjahr mit bis zu 40% einher (Lowenfels *et al.*, 1997; Howes *et al.*, 2000). Das Risiko, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln, ist bei Patienten mit HP unter 40 Jahren sehr gering, steigt jedoch mit 60 Jahren auf 20% und mit 70 Jahren auf 40% an (Howes *et al.*, 2000).

1.4.3.2. Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS)

Das Peutz-Jeghers-Syndrom wird autosomal-dominant, mit einer Inzidenz von etwa 1:25000, vererbt. Charakteristisch sind multiple hamartomatöse Polypen des Gastrointestinaltraktes und melaninhaltige mukokutane Makulae der Lippen, Wangenschleimhaut, Axilla, Finger und Zehen. Die Ursache des PJS ist eine Mutation im STK 11-Gen (Serin/Threonin-Kinase 11) (Jenne *et al.*, 1998; Tersmette *et al.*, 2001). Das PJS geht einher mit einem erhöhten Risiko für Gastrointestinale-, Brust- und Pankreaskarzinome (Boardman *et al.*, 1998). Ungefähr 50% der PJS-Patienten entwickeln eines dieser Karzinome (Giardiello *et al.*, 1987; Hizawa *et al.*, 1993; Boardman *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999). Das relative Risiko ein PC zu entwickeln ist auf das 132-fache erhöht (Tabelle 1) (Giardiello *et al.*, 1987 und Boardman *et al.*, 1998).

1.4.3.3. Das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom

Bei dem hereditären Mamma- und Ovarialkarzinom liegt ein autosomal-dominanter Erbgang mit einer Keimbahnmutation in einem der beiden „Breast Cancer“ Gene, BRCA1 oder BRCA2 (3-79%) vor (Frank *et al.*, 2002). Außer einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Mamma- und Ovarialkarzinomen tragen diese Familienmitglieder, insbesondere Träger einer Mutation des BRCA2-Gens, ein relatives Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms, das auf das 3,5-fache und bei Personen jüdischer Herkunft mit einer spezifischen BRCA2-Mutation (BRCA2 6174delT) auf das 8-fache geschätzt wird. Dies bedeutet ein kumulatives Lebenszeitrisko von 3,2 bzw. 7% (Tabelle 1) (Tulinius *et al.*, 1994; The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999; Peltomäki *et al.*, 2001).

1.4.3.4. Familial Atypical Multiple-Mole-Melanoma-Syndrom (FAMMM-Syndrom)

Das familiäre atypische multiple Muttermal und Melanom (FAMMM)-Syndrom ist eine seltene, autosomal-dominante Erkrankung mit inkompletter Penetranz. Sie zeichnet sich durch multiple (>50), zum Teil dysplastische Nävi und mindestens ein kutanes oder intraokulares Melanom bei einem oder mehr Verwandten ersten oder zweiten Grades aus (Bergman *et al.*, 1990). 25% der FAMMM-Familien weisen zusätzlich ein Pankreaskarzinom, assoziiert mit einer Keimbahnmutation im CDKN2A-Gen auf (Goldstein *et al.*, 1995; Whelan *et al.*, 1995; Ciotti *et al.*, 1996; Vasen *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2002).

In FAMMM-Familien ist für die Träger einer CDKN2A-Mutation die Wahrscheinlichkeit, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln, um das etwa 13- bis 22-fache erhöht (Tabelle 1) (Goldstein *et al.*, 1995). Vasen *et al.* fanden ein kumulatives Risiko von 17% bis zum Alter von 75 Jahren, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln (Vasen *et al.*, 2000). Das gemeinsame Auftreten von Melanomen und Pankreaskarzinomen in einer Familie, mit einer zusätzlichen Keimbahnmutation des CDKN2A-Gens, etablierte sich als eigenständiges Tumoprädispositionssyndrom: Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom (PKMS) (Whelan *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 2000).

Tabelle 1: Tumorprädispositionssyndrome mit erhöhtem Pankreaskarzinomrisiko (aus Wong *et al.*, 2001).

Tumorsyndrome	Erb- modus	Gen	Genort	Mutationen¹	Relatives Risiko für PC (%)
Hereditäre Pankreatitis	a-d	PRSS1 (~70%)	7q35	R122H A16V D22G K23R N29I N29T R122C	70-100 ²
FAMMM (Familial atypical multiple mole melanoma)	a-d	CDKN2A	9p21	G259S R232TER 6-BP DEL 3-BP DUP (R105INS) M53I R24P 24-BP DUP -34G-T V126D IVS2, A-G, -105 G122R V59G	13-22 ²

Tumorsyndrome	Erbmodus	Gen	Genort	Mutationen ¹	Relatives Risiko für PC (%)
Peutz-Jeghers-Syndrom	a-d	STK11/ LKB1	19p13.3	DEL/INV EX4-7 Y253TER 1-BP DEL, 843G 4-BP DEL, 716GGTC IVS3, G-A, -1 K84TER 2-BP DEL, NT277 L67P 9-BP DEL E57TER 1-BP DEL, 1407C 1-BP DEL INS, 535T W239C 1-BP DEL, 890G Y246TER	bis zu 132 ²
Hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom	a-d	BRCA2	13q12-13	6-BP DEL, PHE-TER 2-BP DEL, 6503TT 2-BP DEL 1-BP DEL 4-BP DEL 1-BP DEL, 8525C 3-BP DEL, T1302DEL 1-BP DEL, 6174T 5-BP DEL, NT999 1-BP INS, 3295A 2-BP DEL, 8765AG IVS23AS, A-G, -2 4-BP DEL, NT3034 T2722R	3,5-10 ²

Tumorsyndrome	Erbmodus	Gen	Genort	Mutationen ¹	Relatives Risiko für PC (%)
Familiäres Pankreaskarzinom	a-d	k.A.	k.A.	k.A.	18-57 ³
HNPCC (Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom)	a-d	MLH1 (~30%)	3p21.3	S252TER S44F 3.5-KB DEL IVS5, G-A, -1 IVS14DS, 7-BP DEL und 4-BP INS H329P 1-BP DEL, 1784T R226TER G67W K618A E578G EX16DEL -42, C-T T117M K616DEL P648S S269TER AL681T 3-BP DEL, 213AGA EX18DEL	k.A.

Tumorsyndrome	Erbmodus	Gen	Genort	Mutationen ¹	Relatives Risiko für PC (%)
HNPCC (Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom)		MSH2 (~60%)	2p22-p21	P622L DEL 50 CODONS R406TER H639Y 3-BP DEL, N596DEL R524P 1-BP DEL DEL EXON 5 A636P 24-BP INS 11.4-KB DEL EX1-6 DEL 4-BP DEL, 1452AATG IVS12AS, T-A, -5 IVS5DS, A-T, +3	
		MSH6	2p16	1-BP DEL, LEU222TER 1-BP DEL, FS570TER VAL878ALA 1-BP INS, 650T 2-BP DEL, 3052CT 13-BP DEL 4.9-KB DUP	

Tumorsyndrome	Erbmodus	Gen	Genort	Mutationen ¹	Relatives Risiko für PC (%)
		PMS1	2q31-33	Q233TER	
		PMS2	7p22	3-BP DEL, LYS412DEL 1-BP DEL, 1021A 2-BP INS, 1144+2 ARG628TER 1-BP DEL, 856G	
		MLH3	14q24.3	Q24E N499S E624Q E1451K	
Li-Fraumeni-Syndrom	a-d	TP53 (~50%)	17p13	R248W E258K G245C L252P C242Y G245D R248Q M133T V272L 1-BP INS, 151C R273H G325V 1-BP DEL, CODON 257 R175H L344P A138P 1-BP DEL K292I 11-BP DEL/5-BP INS Y220S	k.A.

Tumorsyndrome	Erbmodus	Gen	Genort	Mutationen ¹	Relatives Risiko für PC (%)
FAP-Gardner-Syndrom	a-d	APC (~80%)	5q21	2-BP DEL, EX7 ARG-TER, 904C-T 1-BP DEL, EX10 TYR-TER, 1500T-G R414C R302TER	4,5 ²
AT (Ataxia teleangiectatica)	a-r	ATM	11q22-23	3-BP DEL, S1512DEL 9-BP DEL, CODONS 1198-1200 6-BP DEL, CODONS 1079-1080 137-BP INS, NT5762 V2424G 9-BP DEL, CODONS 2546-2548 R35TER D2625E D2626P 5-BP DEL, NT7884 3245ATC-TGAT 3-BP DEL, V2662DEL 3576G-A R2443TER IVS10AS, T-G, -6 4-BP DEL, 65-BP INS 2250G-A	k.A.

1 = Auswahl an Mutationen

2 = für Verwandte ersten Grades einer an PC erkrankten Person in Abhängigkeit von der Anzahl an PC erkrankter Personen in der Familie

3 = für Träger der entsprechenden Anlage

k.A.= keine Angaben

1.5. Der CDKN2A-Genlocus

Das CDKN2A-Gen, (Cyclin dependent kinase 2A) lokalisiert auf dem menschlichen Chromosomenabschnitt 9p21, (Kamb *et al.*, 1994; Nobori *et al.*, 1994) ist genomisch ungewöhnlich komplex organisiert. Es kodiert durch zwei unterschiedliche Leseraster für zwei verschiedene Transkripte, $p16^{\text{INK4A}}$ und $p14^{\text{ARF}}$, die beide als Tumorsuppressoren agieren (Quelle *et al.*, 1995).

Jedes Transkript verfügt über ein spezifisches 5' Exon (ex1 α oder ex1 β), das mit dem gemeinsamen Exon 2 und im Fall von INK4a zusätzlich mit dem Exon 3 gespliced wird. Das Exon 1 α beinhaltende Transkript kodiert für $p16^{\text{INK4A}}$ und das Exon1 β beinhaltende Transkript kodiert für $p14^{\text{ARF}}$ (Abb. 2, A) (Serrano *et al.*, 1996).

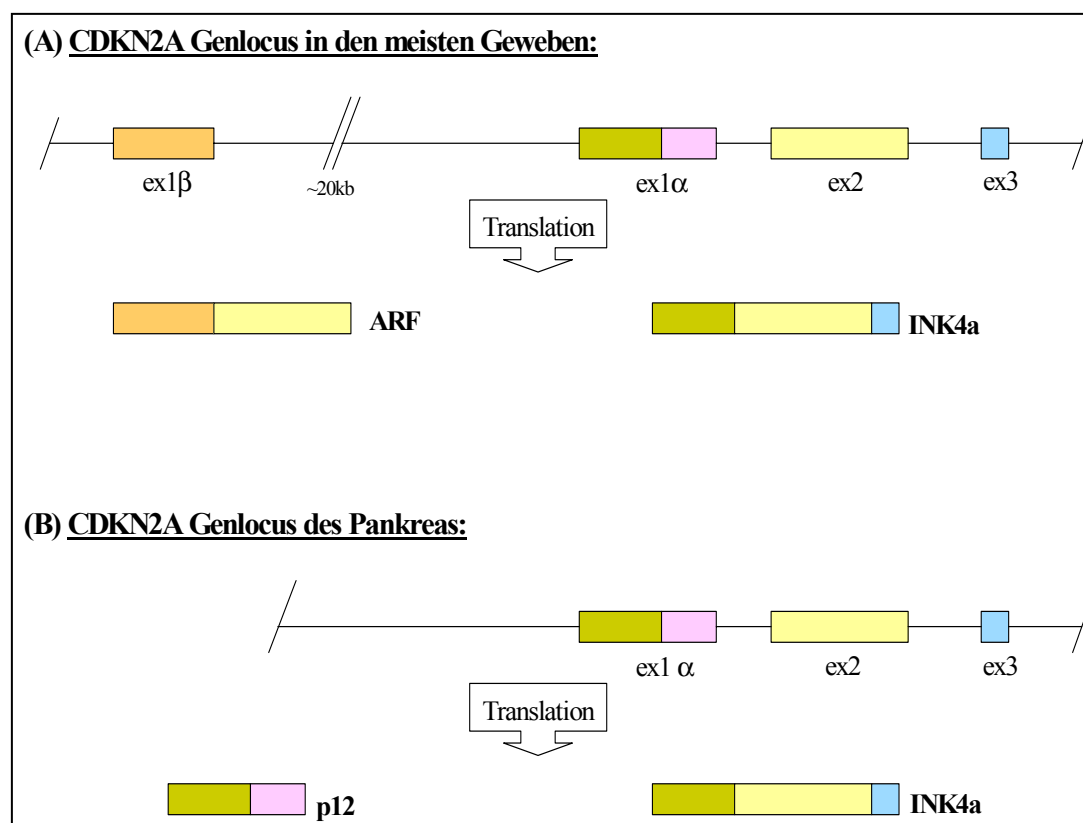


Abbildung 2: Gewebespezifisches alternatives Splicing in dem humanen, den Zellzyklus regulierenden CDKN2A-Locus.

- (A) Schematische Darstellung des humanen CDKN2A-Locus zeigt die Splicemuster, die in den meisten Geweben vorliegen, sowie die zwei Proteine, die durch alternative Leseraster erzeugt werden.
- (B) Das schematische Diagramm des CDKN2A Splicemusters in normalem humanem Pankreasgewebe. ARF mRNA ist nicht nachweisbar, während die alternative Splicevariante des INK4a-Locus, p12 genannt, abgebildet ist.

Alternative reading frame; murine p19 ARF; human p14 ARF (ARF) beinhaltet das dem restlichen Gen 20 Kb vorgeschaltete alternative erste Exon (Exon1 β) (Abb. 2, A). Dieses Transkript enthält ein „alternate open reading frame“ (ARF), das strukturell nicht mit den Produkten der anderen Varianten verwandt ist. ARF arretiert den Zellzyklus in der G1 und der G2 – Phase (Quelle *et al.*, 1995), indem es an das Protoonkogen MDM2 (MDM steht für murine double minute, da das Gen initial in der Maus entdeckt wurde; das humane MDM2 wird daher auch als HDM bezeichnet) bindet und dessen Degeneration induziert. Dadurch wird der Tumorsuppressor p53 stabilisiert (Zhang *et al.*, 1998). MDM2 besitzt die Fähigkeit p53 zu binden und zu ubiquitinieren (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997; Levine, 1997).

Das Transkript p16^{INK4A} des CDKN2A Gens (Abb. 2, A/B), wirkt als direkter Zellzyklusinhibitor, indem er die Cyclin dependent kinase 4/6 (CDK 4/6) abhängige Phosphorylierung des Retinoblastomproteins pRb und der „Taschenproteine“ p107 und p130 inhibiert (Serrano *et al.*, 1993; Ruas und Peters, 1998). Dadurch bleiben die Wachstums- und Regulationsproteine, einschließlich des pRb, weiterhin an den Transkriptionsfaktor E2F gebunden. Dieser Komplex bewirkt ein Arretieren in der G1 (von „gap“, Lücke) Phase und verhindert somit unkontrolliertes Zellwachstum (Riley *et al.*, 1994). Beide beschriebenen Mechanismen können zu einer Entkopplung des Zellzyklus führen und damit ein unkontrolliertes Zellwachstum und die Tumorentstehung initiieren (Abb. 3).

p12^{INK4A} stellt eine erstmals 1999 entdeckte Spleißvariante des CDKN2A Gens dar (Abb. 2, B) (Robertson und Jones, 1999). Das p12-Transkript entsteht durch die Verwendung einer alternativen „splice donor site“ innerhalb des Intron 1 (Abb. 2, B). Es produziert ein 12 kD großes Protein, bestehend aus INK4a Exon 1 α einem neuen C – Terminus (Abb. 2, B und 5).

Aus der engen Nachbarschaft des für p15^{INK4b} kodierenden Gens CDKN2B zum INK4a-Lokus resultiert eine weitere Komplexität des CDKN2A Gens. p15^{INK4b} spielt als Cyclin-abhängiger-Kinase-Inhibitor eine wesentliche Rolle bei der Umwandlung des von Transforming Growth Factor (TGF) induzierten Zellzyklusarrestes (Hannon und Beach, 1994).

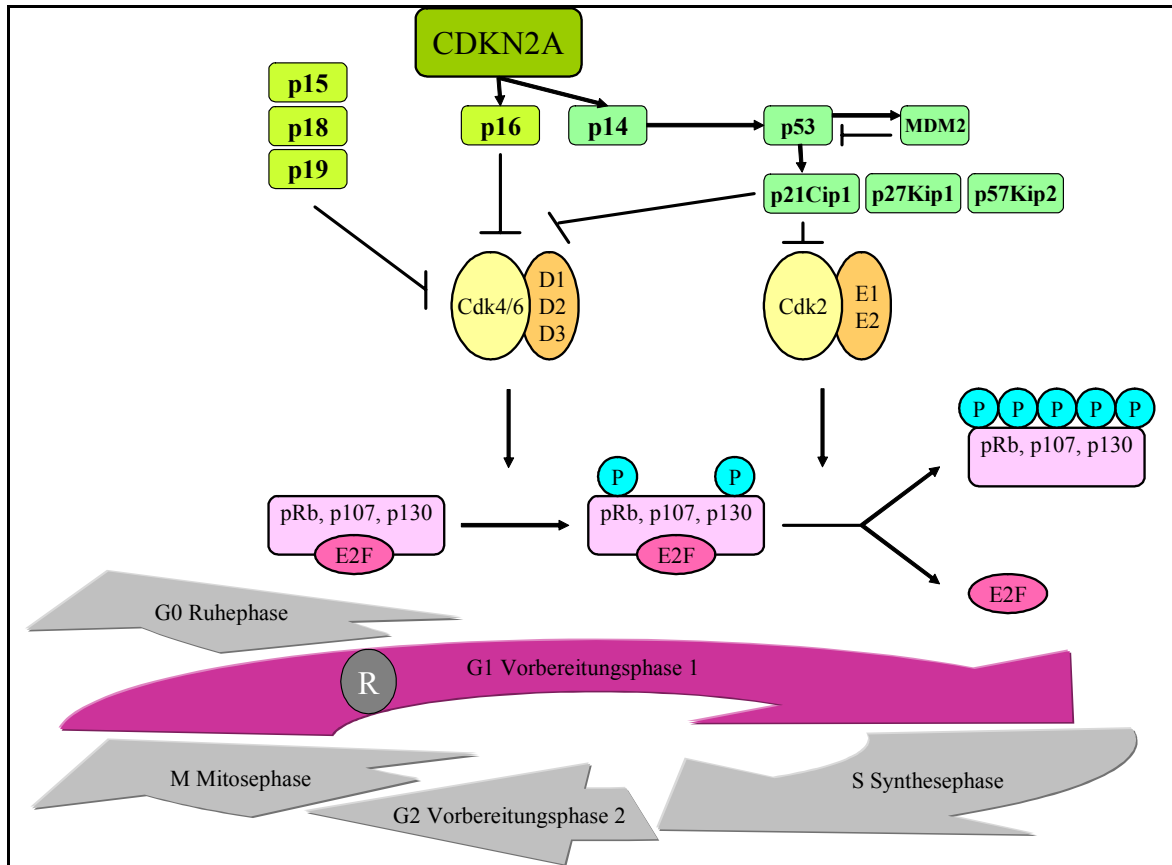


Abbildung 3: Die Regulation der G1/S-Transition durch den Cdk4/6-Cyclin D/INK4/Rb Signaltransduktionsweg.

Der funktionelle Status-quo der Rb-Proteinfamilie darunter pRb, p107 und p130, kontrolliert die Progression des Zellzyklus durch die G1-Phase. In der G0-Phase sind die Rb-Proteine in einem nicht-phosphorylierten Zustand, wodurch sie in der Lage sind unter anderem an Proteine der E2F-Familie von Transkriptionsfaktoren zu binden und dadurch die E2F vermittelte Transkription zu verhindern.

Die Aktivierung der Cdk4- und /oder Cdk6-Kinasen durch ihre mitogen-kontrollierten regulatorischen Untereinheiten (D-Typ Zykline D1, D2 und D3), ist eine der ersten Schritte in der G1-Phase. Die Phosphorylierung der Rb-Proteine durch den Cdk4/6-Zyclin D-Komplex führt zu ihrer partiellen Dephosphorylierung und damit zur Transkription durch E2F-kontrollierter Gene, wie Cyclin E1, welches wiederum die Downstream Kinase Cdk2 aktiviert.

Die Aktivität des Cdk4/6-Komplexes wird negativ durch die INK4-Familie der Zellzyklus-Inhibitoren reguliert. Diese Proteine verhindern die Bildung des Cdk4/6-Cyclin D-Komplexes.

Wenn Cip/Kip-Proteine an den Cdk4/6-Cyclin D-Komplex binden, können sie daran gehindert werden die Cdk2-Cyclin E Aktivität zu blockieren und aktivieren dadurch Cdk2.

Die Hyperphosphorylierung der Rb-Proteine durch den Cdk2-Cyclin E-Komplex wird jedoch zur regelrechten G1/S Transition und der Initiation der S-Phase benötigt.

Die Position des Restriktionspunktes (R) während der G1-Phase ist willkürlich (modifiziert nach Ortega *et al.*, 2002).

Das p14^{ARF}-Transkript des CDKN2A-Locus und das p15^{INK4B}-Transkript des CDKN2B-Locus, lokalisiert auf dem Chromosomenabschnitt 9p21, sind zwei der am häufigsten von Alterationen betroffenen Regionen in menschlichen Tumoren. Der Verlust der Heterozygotie kommt in über der Hälfte der Blasentumore und Melanomen vor. Homozygote Deletionen findet man in vielen verschiedenen Neoplasien in unterschiedlicher Häufigkeit (Abb. 4). Deletionen innerhalb der Gene, die für p16^{INK4A}, p15^{INK4B} und p14^{ARF} codieren, stellen die häufigste Art der Mutation dar. Punktmutationen, die ausschließlich p16^{INK4A} betreffen, finden sich gehäuft in Pankreaskarzinomen und Melanomen. Es hat sich erwiesen, dass die p14^{ARF} und p15^{INK4B} - Loci in der Tumorentwicklung oft mit epigenetischen Mechanismen, wie dem Verlust der Expression des Promotors aufgrund von Hypermethylierung einhergehen (Ruas und Peters, 1998). p16^{INK4A} wird aus diesem Grund in einigen Malignomen, wie Gliomen, Lungentumoren oder Kopf- und Halstumoren nicht exprimiert (Merlo *et al.*, 1995; Ruas und Peters, 1998). Gleichzeitiger Verlust des einen Allels und Methylierung des anderen Allels ist ein weiterer Grund für die Entwicklung von Tumoren (Ruas und Peters, 1998). Da p16^{INK4A} und p14^{ARF} unterschiedliche Promotoren verwenden (Abb. 4), konnte man mit Hilfe von Methylierungsstudien Aufschluss über den Zusammenhang zwischen verändertem Gen und Tumortyp erhalten. Die spezifische Methylierung des p16^{INK4A}-Promotors kommt häufig bei einem großen Spektrum von Tumoren, v. a. in Myelomen, Blasentumoren und Darmtumoren vor (Ruas und Peters, 1998; Esteller *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu ist die spezielle Inaktivierung des p14^{ARF}-Promotors in nur wenigen Tumorerkrankungen, wie Darm- und Magentumoren, beschrieben worden (Esteller *et al.*, 2001).

Tumorassoziierte Veränderungen des CDKN2A-Locus können ebenso das für p15^{INK4b} kodierende Gen betreffen (Serrano *et al.*, 1996). Spezielle Mutationen, wie Punktmutationen oder kleine Deletionen, die die p15^{INK4b}-Expression verändern, ohne den CDKN2A-Locus zu beeinflussen, sind sehr selten (Ruas und Peters, 1998). Die Inaktivierung der p15^{INK4b}-Expression durch Methylierung des spezifischen Promotors, ohne dass der CDKN2A-Locus beeinflusst wird, beobachtet man am häufigsten in hämatologischen Malignomen, wie Leukämie und Lymphomen (Herman *et al.*, 1996; Malumbres *et al.*, 1997).

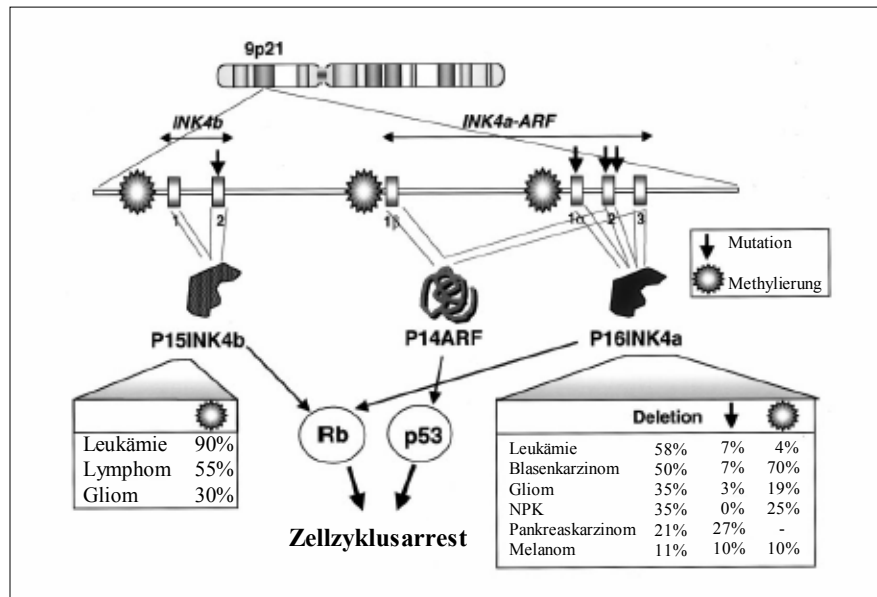


Abbildung 4: Veränderungen der INK4a/ARF- (=CDKN2A) und INK4b (=CDKN2B) Loci in humanen Karzinomen.

Schematische Darstellung der chromosomalen Lokalisation, der Genstruktur und des Proteins kodiert von den INK4a/ARF und INK4b Loci. Die Beteiligung dieser Proteine an den Rb- und p53 Signalwegen ist ebenfalls abgebildet. Dargestellt ist die in menschlichen Tumoren gefundene Inzidenz der genetischen (Deletionen und Punktmutationen) und epigenetischen (Promotormethylation) Veränderungen. (Daten von Herman *et al.*, 1996; Ruas und Peters, 1998; modifiziert nach Ortega *et al.*, 2002).

NPK: Nasopharynxkarzinom

INK4A/p12 des CDKN2A-Locus

atg-gag-ccg-gcg-gcg-ggg-agc-agc-atg-gag-cct-tcg-gct-gac-tgg-	45
M E P A A G S S M E P S A D W	15
ctg-gcc-acg-gcc-gcg-gcc-cgg-ggt-cgg-gta-gag-gag-gtg-cgg-gcg-	90
L A T A A A R G R V E E V R A	30
ctg-ctg-gag-gcg-ggg-gcg-ctg-ccc-aac-gca-ccg-aat-agt-tac-ggt-	135
L L E A G A L P N A P N S Y G	45
cgg-agg-ccg-atc-cag-gtg-ggt-aga-ggg-tct-gca-gcg-gga-gca-ggg-	180
R R P I Q V G R G S A A G A G	60
gat-ggc-ggg-cga-ctc-tgg-agg-acg-aag-ttt-gca-ggg-gaa-ttg-gaa-	225
D G G R L W R T K F A G E L E	75
tca-ggt-agc-gct-tcg-att-ctc-cgg-aaa-aag-ggg-agg-ctt-cct-ggg-	270
S G S A S I L R K K G R L P G	90
gag-ttt-tca-gaa-ggg-gtt-tgt-aat-cac-aga-cct-cct-cct-ggc-gac-	315
E F S E C V C N H R P P P G A	105
gcc-ctg-ggg-gct-tgg-gaa-gcc-aag-gaa-gag-gaa-tga-gga-gcc-acg-	360
L G A W E T L E E E E E TER	120
cgc-gta-cag-atc-tct-cga-atg-ctg-aga-aga-tct-gaa-ggg-ggg-aac-	405
	135
ata-ttt-gta-tta-gat-gga-agt/gtc-atg-atg-atg-ggc-agc-gcc-cga-	450
V M M M G S A R	150
gtg-gcg-gag-ctg-ctg-ctg-ctc-cac-ggc-gcg-gag-ccc-aac-tgc-gcc-	495
V A E L L L L H G A E P N C A	165
gac-ccc-gcc-act-ctc-acc-cga-ccc-gtg-cac-gac-gct-gcc-cgg-gag-	540
D P A T L T R P V H D A A R E	180
ggc-ttc-ctg-gac-acg-ctg-gtg-gtg-ctg-cac-cgg-gcc-ggg-gcg-cgg-	585
G F L D T L V V L H R A G A R	195
ctg-gac-gtg-cgc-gat-gcc-tgg-ggc-cgt-ctg-ccc-gtg-gac-ctg-gct-	630
L D V R D A W G R L P V D L A	210
gag-gag-ctg-ggc-cat-cgc-gat-gtc-gca-cgg-tac-ctg-cgc-gcg-gct-	675
E E L G H R D V A R Y L R A A	225
gcg-ggg-ggc-acc-aga-ggc-agt-aac-cat-gcc-cgc-ata-gat-gcc-gcg-	720
A G G T R G S N H A R I D A A	240
gaa-ggt-ccc-tca-gac-atc-ccc-gat-tga	747
E G P S D I P D TER	249

Abbildung 5: Nukleotidsequenz (kleine Buchstaben) und Aminosäuresequenz (große Buchstaben) der humanen INK4A cDNA (schwarz) und die pankreasspezifische Splicevariante p12 (rot).

1.6. Mutationen des p16^{INK4A}-Gens

Die erste p16^{INK4A}-Keimbahnmutation in einer Familie mit autosomal-dominant vererbtem Pankreaskarzinom und Melanom wurde 1995 von Whelan *et al.* entdeckt. Es handelte sich bei allen betroffenen Familienmitgliedern um eine Keimbahnmutation im Kodon 93 des p16^{INK4A}-Gens, die auf einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Tryptophan (G93W) beruht (Whelan *et al.*, 1995).

Im selben Jahr beschrieben Goldstein *et al.*, dass innerhalb 19 untersuchter Familien mit familiärem Melanom, die eine p16^{INK4A}-Keimbahnmutation tragen, im Vergleich zu Familien ohne diese Keimbahnmutation, ein 22-fach erhöhtes Risiko aufweisen ein Pankreaskarzinom zu entwickeln. In einer dieser Familien konnte außerdem die gleiche Mutation entdeckt werden, die Whelan *et al.* beschrieben haben (Goldstein *et al.*, 1995). 1996 berichteten Ciotti *et al.* über drei weitere Familien mit der p16^{INK4A}-G93W-Keimbahnmutation (Ciotti *et al.*, 1996). In einer Subgruppe von FAMMM-Familien konnte 1995 eine 19-bp-Deletion in Exon 2 des Gens identifiziert werden (Gruis *et al.*, 1995). Alle Mutationen waren in der 2. und 3. Ankyrindomäne lokalisiert, die eine entscheidende Rolle für die Bindungskapazität an CDK4 spielt. Bei einigen Melanomfamilien ohne p16^{INK4A}-Mutation wurde eine Keimbahnmutation in der p16^{INK4A}-Bindungsdomäne des CDK4-Gens (R24C) gefunden (Zuo *et al.*, 1996). Der Verdacht, bei diesen Familien könnte eine CDK4-Mutation für die Häufung von Pankreaskarzinomen und Melanomen verantwortlich sein, konnte in einer Untersuchung von 21 solcher Familien nicht bestätigt werden (Moskaluk *et al.*, 1997).

Moskaluk *et al.* untersuchten 21 Familien mit mindestens zwei erstgradig Verwandten, die von einem Pankreaskarzinom betroffen sind und identifizierte dabei in einer Familie eine p16^{INK4A}-Spleißdonorstellen-Keimbahnmutation an der Exon-2/3-Grenze (D145C). Da diese Familie nicht dem FAMMM-Phänotyp entsprach vermuteten die Autoren, dass p16^{INK4A}-Mutationen in der C-terminalen Region möglicherweise ausschließlich zum Pankreaskarzinom prädisponieren. (Moskaluk *et al.*, 1997).

2002 bestätigten Bartsch *et al.* zwei weitere Mutationen des p16^{INK4A}-Gens. Es handelt sich um die „frameshift Mutation“ c.283-284insG, E119X und die nonsense Mutation c.148 C>T, Q50X. Die betroffenen Patienten stammten aus Familien mit je einem erstgradig Verwandten mit Pankreaskarzinom und einem anderen erstgradig Verwandten mit Melanom. Die frameshift Mutation c. 283-284insG, E119X wurde 1995 von Liu *et al.*, und die nonsense Mutation c.148 C>T, Q50X 1997 von Tanaka *et*

al. und Betticher *et al.* erstmals beschrieben (Liu *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1997; Betticher *et al.*, 1997).

Die bisher geringe Anzahl untersuchter p16-assoziiierter Tumorfamilien lässt keine eindeutige Schlussfolgerung zur Penetranz des Pankreaskarzinoms beim Vorliegen einer p16^{INK4A}-Mutation zu. Das Pankreaskarzinomrisiko kann bis zu 75% betragen.

Nicht bei allen Familien mit den beschriebenen Mutationen traten Pankreaskarzinome auf bzw. in anderen Familien ohne die bekannten Mutationen überwogen die Pankreaskarzinome. Daher liegt die Vermutung nahe, dass außer einer p16^{INK4A}-Keimbahnmutation noch andere genetische Veränderungen oder exogene Faktoren für die Entstehung der Pankreaskarzinome in diesen Familien verantwortlich gemacht werden müssen.

1.7. Fragestellung

Das 1994 erstmals geklonte Tumorsuppressorgen CDKN2A (Kamb *et al.*, 1994; Nobori *et al.*, 1994) ist bei 27-95% der sporadischen dukalen Pankreaskarzinome inaktiviert (Caldas *et al.*, 1994; Bartsch *et al.*, 1995; Naumann *et al.*, 1996) und bei 12-15% der sporadischen Melanome somatisch alteriert (Platz *et al.*, 1996; Monzon *et al.*, 1998).

Aufgrund der Knudson-Hypothese ist eine CDKN2A-Alteration auch bei den familiären Formen des Pankreaskarzinoms zu vermuten. Diese Vermutung konnte aufgrund der Identifizierung von CDKN2A-Keimbahnmutationen in einer Subgruppe von Familien mit FAMMM-Syndrom bestätigt werden. Zu den Mutationen gehören eine Keimbahnmutation im Kodon 93, die eine Aminosäureänderung zur Folge hat (G93W) (Whelan *et al.*, 1995) bzw. eine 19-bp-Deletion in Exon 2 des Gens (Gruis *et al.*, 1995). Einerseits traten nicht in allen Familien mit diesen bekannten Mutationen Pankreaskarzinome auf, andererseits erkrankten mehr Mitglieder an Pankreaskarzinomen in Familien ohne die bekannten Mutationen. Diese Tatsache spricht für weitere umweltbedingte Faktoren oder genetische Veränderungen, die neben einer CDKN2A-Keimbahnmutation für die Entstehung der Pankreaskarzinome in diesen Familien beitragen (Bergman und Gruis, 1996; Whelan *et al.*, 1996).

Da die 1999 entdeckte alternative Splicevariante des CDKN2A-Genlokus p12 ausschließlich in humanen Pankreaszellen exprimiert wird, lag die Vermutung nahe, dass Mutationen in dieser Isoform Pankreaskarzinome in bestimmten Familien hervorrufen könnten.

Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob Mutationen der Splicevariante p12 des CDKN2A-Genlocus ursächlich für ein Pankreaskarzinom im Rahmen eines Familiären Pankreaskarzinoms, eines Pankreaskarzinom-Melanom-Syndroms bzw. eines Familiären atypischen multiplen Muttermal und Melanom-Syndroms sein könnten. Es wurden DNA-Proben von Patienten mit Familiärem Pankreaskarzinom, den beiden Tumorprädispositionssyndromen und Kontrollen von gesunden Probanden mittels PCR untersucht, sequenziert und verglichen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Die nationale Fallsammlung für familiäres Pankreaskarzinom

Nur etwa 3 bis 5% aller Pankreaskarzinome sind familiärer Genese (Lynch, 1994). Deshalb ist es notwendig diese Patienten zu registrieren, um aussagekräftige klinische und genetische Untersuchungen zu erzielen.

Nachdem Henry Lynch 1990 eine der ersten Fallsammlungen von Patienten mit familiärem Pankreaskarzinom aufbaute (Lynch *et al.*, 1990, 1992), etablierte sich 1999 an der Philipps-Universität in Marburg im Rahmen des Projektes „Klinische und genetische Untersuchung des familiären exokrinen Pankreaskarzinoms mit Aufbau einer nationalen Fallsammlung“ (<http://www.med.uni.marburg.de/fapaca>) die „Nationale Fallsammlung Familiäres Pankreaskarzinom“ (FaPaCa). Die Rekrutierung der Patienten läuft über spezialisierte Kliniken, im Rahmen einer Multizenterstudie. Außerdem wird das Projekt im Internet, auf medizinischen Kongressen und in wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Zeitschriften vorgestellt. Zusätzliche Unterstützung erhält das Projekt durch die „Selbsthilfegruppe der Pankreasektomierten“. Nach einer humangenetischen Beratung der Patienten und deren Familienangehörigen geben diese ihr schriftliches Einverständnis, um in die Studie aufgenommen werden zu können. Von jeder Familie wird ein Stammbaum (Abb. 10) über mindestens drei Generationen angefertigt, in dem alle Tumore und sonstige Erkrankungen einschließlich des Alters bei Diagnosestellung genau erfasst werden.

Zur Validierung der histologischen Schnittpräparate wird ein Referenzpathologe am Medizinischen Zentrum für Pathologie der Universität Marburg herangezogen. Die Möglichkeiten einer molekulargenetischen Untersuchung werden mit dem betroffenen Familienmitglied unter Berücksichtigung von Nutzen, Grenzen und Risiken abgewägt (Gerdes *et al.*, 2002).

2.1.1. Ziele der FaPaCa-Fallsammlung

Die Ziele der FaPaCa-Fallsammlung beinhalten die Evaluation des Anteils der familiären Pankreaskarzinome an allen Pankreaskarzinomen in Deutschland im Rahmen einer Multizenterstudie, die folgende Punkte eruieren soll:

1. Entdeckung von prädisponierenden epidemiologischen Risikofaktoren
2. Identifikation von Familien mit mutmaßlicher genetischer Prädisposition zum familiären Pankreaskarzinom
3. Entwicklung eines Früherkennungsprogramms für Hochrisikopatienten
4. Die Identifizierung von Genen bzw. Chromosomenabschnitten, die für die Entstehung dieser Erkrankung verantwortlich sind (Gerdes *et al.*, 2002).

2.1.2. Einschlusskriterien

In die Fallsammlung werden Patienten aufgenommen, bei denen

- sowohl selbst, als auch bei mindestens einem erstgradig Verwandten ein histologisch gesichertes, duktales Adenokarzinom des Pankreas nachgewiesen werden kann.
- die ein histologisch gesichertes, duktales Adenokarzinom des Pankreas aufweisen und einen erstgradig Verwandten mit histologisch gesichertem Malignen Melanom haben oder vice versa.

2.1.3. Ausschlusskriterien

Aus der Fallsammlung werden Patienten ausgeschlossen bei

- Nichterfüllen eines der oben genannten Einschlusskriterien (Rieder *et al.*, 2002).
- Bestehen einer Schwangerschaft.
- Minderjährigkeit.

2.1.4. Bisherige Ergebnisse

Im Dezember 2002 wurde die DNA von 23 Familien der Nationalen Fallsammlung Familiäres Pankreaskarzinom der Philipps-Universität Marburg auf Mutationen des CDKN2A Genlocus untersucht. Dabei handelte es sich in 18 Familien um das Familiäre Pankreaskarzinom (mindestens zwei Verwandte ersten Grades weisen ein Pankreaskarzinom auf), und in 5 Familien um das FAMMM-Syndrom (mindestens ein Patient weist ein Pankreaskarzinom und ein weiterer Verwandter ersten Grades weist ein malignes Melanom auf). Analysiert wurde die Prävalenz von Mutationen des CDKN2A Genlocus, der für die Proteine p16/INK4a und p14/ARF kodiert. Keine der 18 Familien mit ausschließlich einem Pankreaskarzinom wies eine Mutation auf, im Gegensatz zu zwei von fünf Familien, die von einem Pankreaskarzinom und malignen Melanom betroffen sind. In einer Familie konnte eine frameshift Mutation (c.323-324insG; E119X) und in der anderen Familie eine nonsense Mutation (c.188C>T, Q50X) nachgewiesen werden (Bartsch *et al.*, 2002).

Tabelle 2: Bisherige Ergebnisse der Mutationsanalysen des CDKN2A-Gens bei Patienten der Fallsammlung (Bartsch *et al.*, 2002).

Gen	Anzahl der Familienmitglieder	PC-Fälle/ Alter bei Diagnose	MM-Fälle/ Alter bei Diagnose	Andere Tumoren in der Familie	Mutation/ Mutations- typ
CDKN2A	20	1/55	1/52	1 Magenkarzinom	Q50X/ nonsense
	13	1/52	1/19	keine	E119X/ nonsense

Tabelle 3: Bisherige Ergebnisse der Mutationsanalysen des BRCA2-Gen bei Patienten der Fallsammlung (Hahn *et al.*, 2003).

Gen	Anzahl der Familienmitglieder	PC-Fälle/ Alter bei Diagnose	Andere Tumoren in der Familie	Mutation/ Mutations- typ
BRCA2	27	3/42, 60, 67	1 Magenkarzinom, 1 Ovarialkarzinom	4075delGT/ frameshift
	10	2/65, 65	keine	6672insT/ frameshift
	19	4/46, 47, 58, 78	1 Osteosarkom, 1 Erythremia, 2 Kolonkarzinome	6819delTG/ frameshift

2.2. Material

2.2.1. Patienten und Kontrollen

In dieser Arbeit wurden insgesamt 25 Proben genomischer DNA von Patienten untersucht, die im Rahmen der Deutschen Fallsammlung für familiäres Pankreaskarzinom bereits rekrutiert wurden. Davon erfüllten 21 Patienten die Einschlusskriterien für ein Familiäres Pankreaskarzinom (FPC), ein Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom (PKMS) bzw. ein „familial multiple mole melanoma-Syndrom“ (FAMMM) (Tabelle 4).

Die Abteilung für theoretische Chirurgie der Uniklinik Marburg stellte die dafür notwendigen DNA-Proben, die aus Vollblut isoliert wurden, zur Verfügung.

Als Negativ-Kontrolle und zum Ausschluss von Polymorphismen wurden 42 Proben genomischer DNA von Probanden untersucht, die selbst und familiär nicht von einem Pankreaskarzinom betroffen sind.

Die Indexpatienten des FPC, des PKMS und des FAMMM sind selbst jeweils von einem Pankreaskarzinom, malignem Melanom, Mammakarzinom oder multiplen Naevi betroffen. Die vorliegenden Daten sind aus den Untersuchungen an histologisch gesichertem Tumorgewebe der betroffenen Personen und einem 3 Generationen umfassenden Stammbaum, der im Rahmen des genetischen Beratungsgesprächs erstellt wurde, erhoben worden.

Tabelle 4: Einteilung der 25 Indexpatienten in die Tumorsyndrome Familiäres Pankreaskarzinom (FPC), Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom (PKMS) und „familial multiple mole melanoma-Syndrom“ (FAMMM).

ID	EA	FPC	PKMS	FAMMM	Erst-diagnose	Verwandte 1°			Andere Karzinome bei Verwandten 1°
						PC	MM	MN	
22-5-0587-2	PC		X		63		1		Prostatakarzinom, Mammakarzinom, Gehirntumor
25-1-000042-106	MM		X		34	1			Mammakarzinom, Basalzellkarzinom
25-1-000042-1°	BCC		X		36	1	1		Mammakarzinom
25-3-000038-20208*	PC		X		68	2			-
25-6-000035-2	MM		X		65	2			Lungenkarzinom
25-9-000044-2	PC			X	60	2		2	-
01-6-0365-1	PC		X		65		1		-
11-6-0159-1°	PC				57			1	-
12-6-0699-1	PC	X			62	1	k.A.		k.A.
12-7-0670-2	PC	X			64	1			Lungenkarzinom
17-5-0437-1	PC			X	67		1	4	-
19-4-0015-1°	PC		X		64				Lungenkarzinom, Basalzellkarzinom (3)
21-5-0660-2	PC			X	45		1	3	Prostatakarzinom
22-5-0256-2	PC		X		55		1		Magenkarzinom
25-4-000048-2	PC	X			52	1			Mammakarzinom
25-6-000050-101		X			65	1			Lungenkarzinom
25-8-000049-104	PC	X			55	1			Lungenkarzinom
25-1-000024-103	PC	X			41	1			-
11-6-0159-13°	MN				35	1			-
12-1-0435-2		X			60	1			-
22-3-0639-1	PC	X			64	1			-
09-2-0552-2	PC	X			43	2			-
06-9-0721-1	PC	X			k.A.	1			k.A.
25-7-000030-2*	PC ?		X		60	2			Malignes Melanom (Nichte)
25-7-000033-2	PC	X			64	1			Mammakarzinom, Lymphdrüsenkarzinom, Lungenkarzinom

ID = Identifikationsnummer; EA = Eigenanamnese; PC = Pankreaskarzinom; MM = malignes Melanom; BCC = Mammakarzinom
MN = Multiple Naevi

* = Es liegt eine PKMS-Familie vor, da ein/e Neffe/Nichte des Indexpatienten ein Malignes Melanom aufweisen

° = Aus der nationalen Fallsammlung ausgeschieden, da Voraussetzungen nicht erfüllt

(3) = drei Verwandte 1° weisen ein Basalzellkarzinom auf

k.A. = Keine Angaben möglich

2.2.2. Kits

Kit	Hersteller	Ort
Dynamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences	Freiburg
QIAamp DNA Blood Midi Kit	Quiagen	Hilden
QIAamp DNA Blood Maxi Kit	Quiagen	Hilden
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Quiagen	Hilden

2.2.3. Synthetische Oligonukleotide

Name	Oligonukleotid	Hersteller	Ort
P12 Exon1 fw	5' > GAG CAG CAT GGA GCC TTC < '3	Roth	Karlsruhe
P16 Exon1 fw	5' > AGC ACC GGA GGA AGA AAG AG < '3	Roth	Karlsruhe
P16 Exon1 bw1	5' > CTC CCT TTT TAT CCC AAA CG < '3	Roth	Karlsruhe
P16 Exon1 bw2	5' > TTC TGA AAA CTC CCC AGG AA < '3	Roth	Karlsruhe

2.2.4. Enzyme

Enzym	Hersteller	Ort
High Fidelity PCR Enzyme Mix 5u/ l	Fermentas	St. Leon-Rot

2.2.5. Enzympuffer

Enzympuffer	Hersteller	Ort
10x High Fidelity PCR Buffer	Fermentas	St. Leon-Rot

2.2.6. Größenmarker

Marker VIII: 35 µl Marker VIII
 35 µl 10x TBE
 180 µl H₂O
 100 µl Farblösung

350 µl Markerlösung (175 ng pro 7 µl)

2.2.7. Auftragspuffer

Glycerin: 3 ml Glycerin
 0,025 mg Bromphenolblau
 0,025 mg Xylencyanol
 H₂O ad 10 ml

2.2.8. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Ort
Agarose	CIBRL	Paisley, Schottland
Aqua ad iniectabilia	Braun	Melsungen
Dimethylsulfoxid 99,7% (DMSO)	Sigma	Deisenhofen
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck	Darmstadt
Ethanol absolut	Riedel-de Haen	Seelze
Ethidiumbromid (10mg/ml)	SERVA	Heidelberg
Magnesiumchlorid 25 mM	Fermentas	St. Leon-Rot
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth	Karlsruhe

2.2.9. Geräte

Geräte	Hersteller	Ort
Agarosegelkämme	AGS	Heidelberg
Agarose-Spannungsgeber	Consort	Heidelberg
Autoklav	Fritz Gössner	Hamburg
Centrifuge 5415C	Eppendorf	Hamburg
Centrifuge Labofuge 400R	Heraeus instruments	Hanau
Gelelektrophoresekammer	AGS	Heidelberg
Gelelektrophoreseschlitten	AGS	Heidelberg
Elektrophoresekammern	BioRad	München
Feinwaage	Sartorius laboratory	Göttingen
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer	Boston, USA
Kühlzentrifuge Sorvall RT 6000	Dupont	Bad Homburg
Micro test tubes (0,2ml; 0,5ml; 1,5ml)	Eppendorf	Hamburg
Mikrowelle	Bauknecht	Schorndorf
Multipipette	Eppendorf	Hamburg
Photometer RNA/DNA Calculator Gene Quant II	Pharmacia Biotech	Cambridge, England
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht
SequencerABI PRISM® 377 DNA	Amersham	Freiburg
UVT 2035, 302nm mittelwellig	Herolab	Wiesloch
Video Copy Processor	Herolab	Wiesloch
Videokamera E.A.S.Y. 429K	Herolab	Wiesloch
Vortexer	Heidolph	Schwabach
Wasserbäder	LAUDA	Lauda-Königshofen

2.2.10. Software

Software	Hersteller	Ort
Sequencher Version 4.2	Gene Codes Corporation	Michigan, USA

2.3. METHODEN

2.3.1. Isolierung von genomischer DNA aus humanem Vollblut

Die Extraktion der DNA aus peripherem venösem Vollblut wurde mittels QIAamp DNA Blood KIT vorgenommen.

Durchführung:

500µl QIAGEN Protease wurde in ein 50 ml Zentrifugengefäß pipettiert, mit 5ml Blut versetzt und kurz durchgemischt. Nach dem Hinzufügen von 2ml Puffer AL wurde die Probe 3x für jeweils 5 sek. gemischt. Es folgte eine Inkubation von 10 min. in einem auf 70° C vorgewärmten Wasserbad. Es wurden 5ml 100%iges Ethanol zugesetzt und unter vortexen vermischt. Die Lösung wurde vorsichtig auf eine QIAamp-Säule in einem 50ml Zentrifugengefäß versetzt und bei 1850g für 3 Minuten zentrifugiert, Anschließend wurde der Überstand verworfen, 5ml Puffer AW1 hinzugefügt und nochmals bei 4500g für eine Minute zentrifugiert. Nach Zugabe von 5ml Puffer AW2 auf die QIAamp-Säule wurde bei 4500g für weitere 15 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Zentrifugengefäß versetzt, 300µl HPLC-Wasser hinzupipettiert, für 5 min. bei RT inkubiert und bei 4500g für 5 min. zentrifugiert. Um die maximale Konzentration zu erhalten, wurden die filtrierte 300µl wiederholt auf die Säule versetzt, bei Raumtemperatur 5 min. inkubiert und für 5 min. bei 4500g zentrifugiert.

2.3.2. Konzentrationsbestimmung von DNA

Nukleinsäurelösungen besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm und können dadurch UV-spektrometrisch vermessen werden. Ihre Reinheit wird über den Quotienten aus den optischen Dichten bei 260 und 280 nm bestimmt, da störende Proteine bei beiden Wellenlängen, Nukleinsäuren jedoch nur bei 260 nm absorbieren. Die Reinheit für DNA sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Eine optische Dichte von 1,0 bei 260 nm entspricht 50 ng/ml Doppelstrang-DNA.

Durchführung:

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mittels Photometer bei einer Absorption von 260 nm. Nach dem Abgleich mit HPLC-Wasser wurden 1:10 oder 1:50 Verdünnungen der Nukleinsäurelösungen in einer 100µl Quarzküvette gemessen.

2.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wird als *in vitro* Technik eingesetzt, um einen genau definierten Teil eines DNA-Abschnittes zu vervielfältigen (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Um die DNA mit Hilfe der PCR zu amplifizieren werden Oligonukleotidprimer verwendet, die als komplementäre DNA-Fragmente den definierten Bereich als Start- und Stoppsignal flankieren. Die DNA-Polymerase synthetisiert mit Nukleotiden eine komplementäre Sequenz, die sich an den denaturierten DNA-Einzelstrang anlagert. Der Doppelstrang wird durch Erhitzen wieder aufgespalten, und nach Anlagerung der Primer bildet die Polymerase erneut komplementäre Stränge. Voraussetzung für diesen Ablauf stellen Pufferlösungen dar, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sichern. Die Polymerasekettenreaktion findet im Thermocycler (GeneAmp 2400) statt, der die Reaktionsgefäße präzise auf die Temperatur erhitzt und kühlt, die für den jeweiligen Schritt der Reaktion benötigt wird.

Durchführung:*PCR-Ansatz:*

Reagenz	Eingesetzte Menge in µl
10x PCR-Puffer	5,0
MgCl ₂	2,0
Primer 1	2,0
Primer 2	2,0
dNTPs	1,0
DMSO	2,0
Platinum-Taq-Polymerase	0,4
DNA	50 oder 100 ng/µl eingesetzt

HPLC-H ₂ O	auf 50µl Gesamtvolumen auffüllen
-----------------------	----------------------------------

Es wurden jeweils eine Positivkontrolle (DNA der Kontrollgruppe) und eine Negativkontrolle (HPLC-H₂O) mitpipettiert, die alle Reagenzien mit Ausnahme der Patienten DNA enthielten.

PCR-Bedingungen:

Temperatur	Zeitabfolge	
94°C	10 min	
94°C	1 min	3 Tmp., 33 Zyklen
50°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C	∞	

2.3.4. Agarosegelelektrophorese

2.3.4.1. Qualitativ

Das PCR-Produkt kann durch Agarosegelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert werden. Dazu wurden jeweils 5µl DNA mit 1,5 µl Auftragspuffer in ein 1% Agarosegel eingebracht, das mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt ist. Das mit TBE Puffer überschichtete Gel wurde in einer Kammer bei 70 Volt ca. 30 Minuten angeschlossen, wobei sich die PCR-Fragmente nach Größe auftrennten. Als Standard diente eine 590bp-Leiter. Die Identifizierung und Charakterisierung der resultierenden Banden erfolgte mittels UV-Licht.

2.3.4.2. Quantitativ

Nach dem Aufreinigen der PCR-Produkte folgte eine quantitative Gelelektrophorese. Jeweils 2 µl aufgereinigte DNA wurde mit 1,5 µl Auftragspuffer in eine Geltasche aufgetragen. Als Standard diente ein 25ng/µl und ein 50ng/µl Marker. Die DNA wurde

nach ca. 2-3 Minuten bei 70 Volt in das Gel einlaufen gelassen und erneut mit UV-Licht beurteilt.

2.3.5. Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die DNA-Fragmente von überschüssigen Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen zu befreien, wurde das QIAquick PCR Purifikations Kit der Firma Qiagen verwendet. Es beruht auf dem Prinzip der selektiven Bindungseigenschaften von Silikatmembranen. Die DNA wird in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an die Membran gebunden, während andere Komponenten die Membran passieren.

Durchführung:

Jeweils 45µl der PCR-Produkte wurden mit 225µl PB-Puffer des Kits auf Säulchen pipettiert. Nach 30-60 Sekunden Zentrifugieren und Verwerfen des Durchlaufes, wurden weitere 750µl PE-Puffer auf die Säulchen pipettiert. Anschließend erneutes zweimaliges Zentrifugieren 30-60 Sekunden, dazwischen wurde der Durchlauf verworfen. Abermals wurden die Säulchen zentrifugiert und anschließend in 1,5ml Reagenzgefäße gesetzt, 30µl HPLC-H₂O auf die Säulchen pipettiert, 1 Minute inkubiert und 1 Minute lang abzentrifugiert. Die Proben müssen bei -20°C gelagert werden, da es ohne Puffersystem zur Degradierung der DNA kommen könnte.

2.3.6. Sequenzierung

(Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgt nach der von Sanger *et al.* (1977) erstmals beschriebenen Didesoxymethode, auch „Kettenabbruch-Synthese“ genannt. Das Prinzip gleicht in der Reaktion den drei Schritten der PCR. Dabei wird zunächst der komplementäre Strang zu einer einzelsträngigen DNA-Matrize von einer DNA Polymerase synthetisiert. Dazu benötigt die Polymerase einen Primer, an dessen freies 3'-OH Ende die Polymerase mit der Reaktion beginnen kann. Zusätzlich werden dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) als Bausteine für den Prozess verwendet. Der Kettenabbruch erfolgt sequenzspezifisch durch ddNTPs (Didesoxyribonukleosidtriphosphate), die im Vergleich zu dNTPs auch am C₃ Atom der

Ribose keine OH-Gruppe tragen und deshalb nicht verlängert werden können. In dem Reaktionsgemisch befinden sich dNTPs und ddNTPs in einem bestimmten Verhältnis zueinander um zu gewährleisten, dass die jeweils mit dem zuletzt eingebauten, zum Abbruch führenden ddNTP enden, während die größere Fraktion der Moleküle durch den Einbau eines dNTPs lediglich verlängert wird. Die ddNTPs sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dies erlaubt später, zwischen den vier verschiedenen Basen aufgrund der unterschiedlichen spektralen Eigenschaften dieser Farbstoffe zu unterscheiden. Die Reaktionsprodukte werden anschließend im elektrischen Feld mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Kurze DNA-Stränge „laufen“ schneller in Richtung der Anode und werden an einer „Ziellinie“ vom Laser erfasst. Das Laserlicht regt die Farbstoffe zur Emission fluoreszenter Strahlung an, die von einem Detektor erfasst und in elektrische Signale transformiert wird. Ein Computer errechnet aus der Wellenlänge der detektierten Signale auf die jeweils eingebaute Base zurück. So entsteht letztlich ein Sequenzmuster, dass eine zur ursprünglich sequenzierten Matrize komplementäre Basenabfolge zeigt.

2.3.6.1. Sequenz-PCR

Durchführung:

Sequenzieransatz:

Reagenz	Eingesetzte Menge in μl
Sequenzier-Kit	4,0
Amplifikat	40ng bzw. 60ng x 2 μl /
Primer	0,5
HPLC-H ₂ O	auf 10 μl Gesamtvolumen auffüllen

Sequenzier-Bedingungen:

Temperatur	Zeitabfolge	
95°C	2 min	
95°C	0,5 min	3 Tmp., 28 Zyklen
50°C	0,5 min	

60°C	1 min	
4°C	∞	

2.3.6.2. Aufreinigung der Sequenzprodukte

Die Sequenzprodukte wurden unmittelbar nach der Sequenz-PCR mit 10µl HPLC-H₂O aufgefüllt. Von dem im Dyanamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit enthaltenen Na-Acetat + EDTA-Puffer wurden den Proben jeweils 2µl hinzupipettiert und anschließend gemischt. Der Puffer beinhaltet 1,5 M Na-Acetat und 250 mM EDTA. Jeder Probe wurde anschließend 80µl 95%iges Ethanol zugefügt. Nach ausgiebigem Mischen inkubierte das Gemisch für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm RT resultierte ein Überstand, der mittels Pipette abgesaugt wurde. Mit 300µl 70%igem Ethanol wurden die Eppendorfgefäße aufgefüllt und 10 Minuten bei 14000 rpm RT zentrifugiert. Da überschüssige Terminatoren im Ethanol gelöst sind, ist es wichtig, den Überstand schnell und gründlich abzusaugen. Die Pellets wurden ca. 15 Minuten bei 37°C getrocknet und bis zum Auftragen auf die Gelmatrix bei –20°C gelagert.

2.3.6.3. Gel mit ABI 377

Ansatz für ein Gel:

Reagenzien	Eingesetzte Menge
Harnstoff	18g
10x TBE	5ml
Long Ranger	5ml
HPLC-H ₂ O	26ml
10% APS*	250µl
TEMED*	35µl
1x filtrieren (50ml Spritze, Filter 0,22µm)	

*erst kurz vor dem Gießen dazu geben

Das Gel wurde mit Hilfe einer Spritze zwischen die zuvor am Ober- und Unterrand festgeklebten Platten appliziert und eine Stunde lang getrocknet. Nach dem Auspolymerisieren wurde der Kamm gezogen und mit den Zähnen ca. 1-2mm in die Gelfront geschoben.

2.3.6.4. Ablesen der Nukleotidsequenz

Die Originalsequenz mit der Accession Number NM_058197 stammte aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Die Analyse von Homologien der Originalsequenz und den Sequenzen des Patientenkollektivs bzw. des Probandenkollektivs erfolgte mit dem Softwareprogramm Sequencher Version 4.2.

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Ergebnisse der Mutationsanalyse des alternativ gespliceten Exon1 des p12-Gens von 25 Proben genomischer DNA (Abb. 7-9), wovon 21 Patienten mit familiären Pankreaskarzinom, FAMMM bzw. Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom in der Nationalen Fallsammlung für Familiäres Pankreaskarzinom aufgenommen sind. Vier Patienten und deren Familien konnten die Kriterien der Fallsammlung nicht erfüllen.

Zu deren Vergleich und zum Ausschluss von Polymorphismen wurden 42 Proben genomischer DNA aus peripherem Blut von Probanden ohne Pankreaskarzinom untersucht (Abb. 5 und 6).

3.1. Polymorphismussuche im p12-Gen

Bei Durchführung von Sequenzanalysen des Exon 1 des p12-Gens konnten in der genomischen DNA von 42 Probanden keine Polymorphismen nachgewiesen werden.

3.1.1. PCR-Analyse

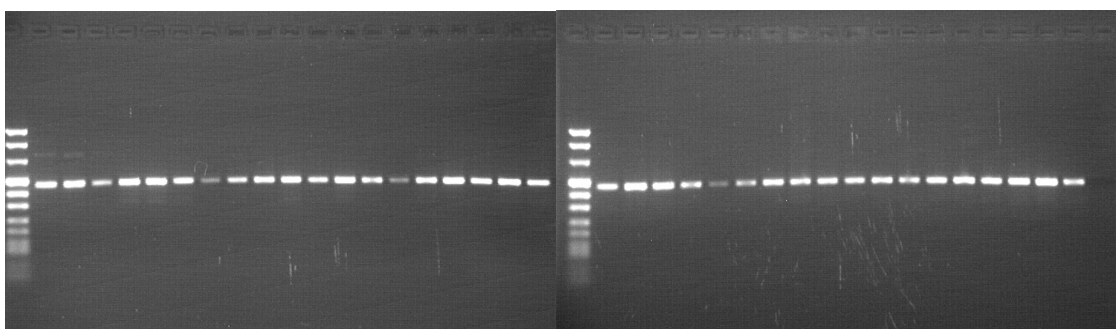


Abbildung 5: PCR des Exon1 von p12, 1%iges Agarosegel.

Bahn 1: Marker VIII, Bahn 2-20: Proband 1-19, Bahn 21: Marker VIII, Bahn 22-38: Proband 20-37.

Bahn 39: Negativ-Kontrolle.

3.1.2. Sequenzanalyse

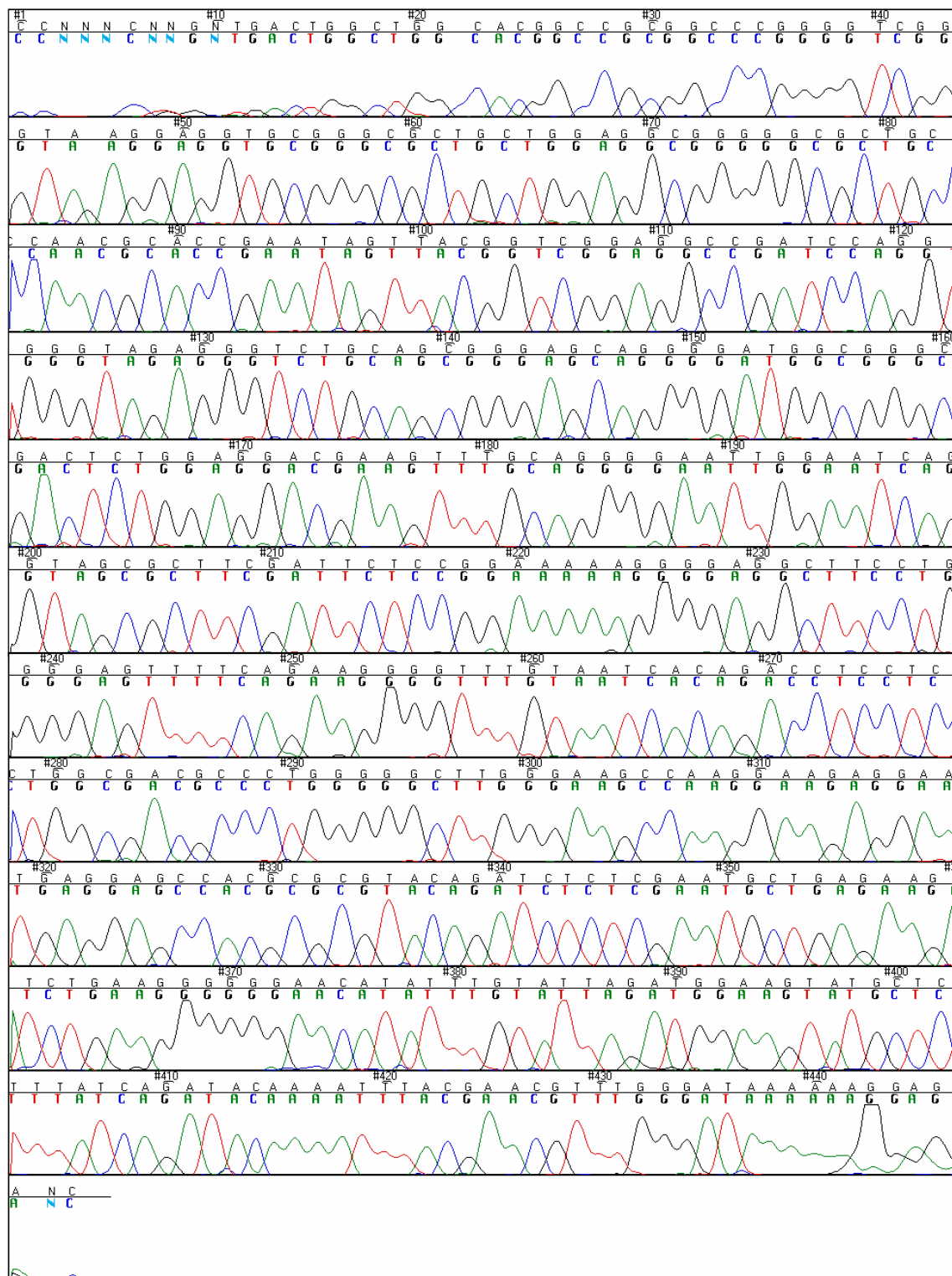


Abbildung 6: Chromatogramm eines Probanden ohne Pankreaskarzinom.

Nukleotidsequenz und Chromatogramm von Exon1 der alternativen Splicevariante p12 des CDKN2A-Gens: #121 bis #321.

3.2. Mutationsanalyse des p12-Gens

Die Mutationsanalyse des p12-Gens der 25 Patienten ergab eine Nonsense-Mutation c.188 C>T (Q50X) des Patienten 22-5-0256-2.

3.2.1. PCR-Analyse

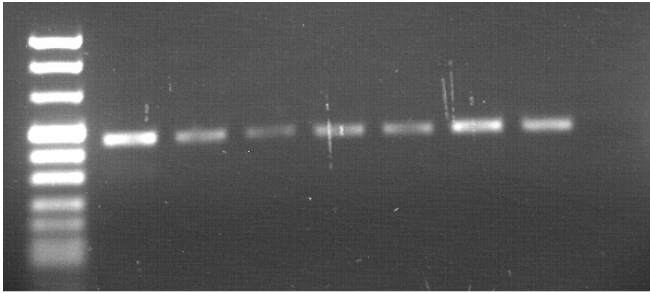


Abbildung 7: PCR des Exon1 von p12, 1%iges Agarosegel.

Bahn 1: Marker VIII, Bahn 2-8: Patienten-DNA, Bahn 9: Negativ-Kontrolle.

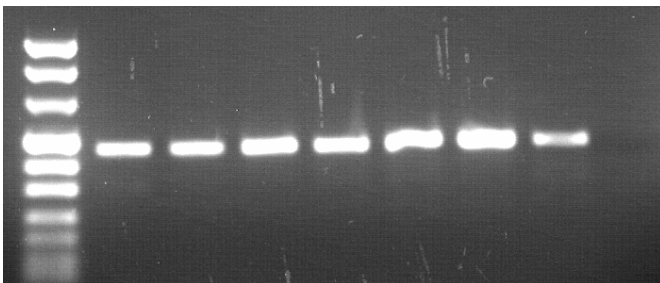


Abbildung 8: PCR des Exon1 von p12, 1%iges Agarosegel.

Bahn 1: Marker VIII, Bahn 2-8: Patienten-DNA, Bahn 9: Negativ-Kontrolle.

3.2.2. Sequenzanalyse

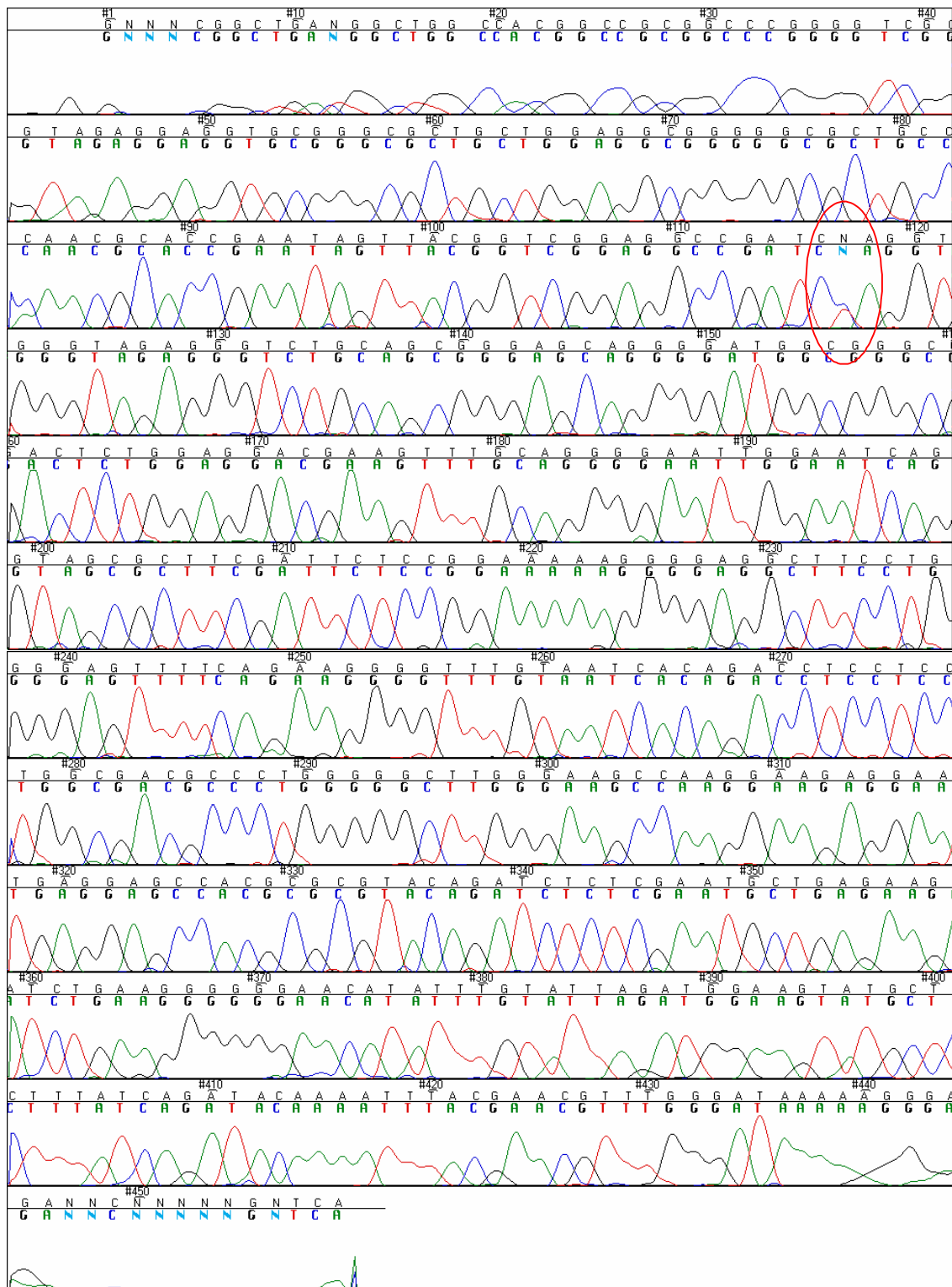


Abbildung 9: Chromatogramm des Patienten 22-5-0256-2 mit der Mutation Q50X (rotes Oval).

Nukleotidsequenz und Chromatogramm von Exon1 der alternativen Splicevariante p12 des CDKN2A-Gens: #120 bis #320.

3.3. Klinische Charakteristika der Familien versus Indexpatienten

In dieser Arbeit wurde der Genlocus p12 INK4A von insgesamt 25 Patienten, die in der nationalen Fallsammlung für familiäres Pankreaskarzinom der Philipps-Universität Marburg aufgenommen sind, untersucht.

In vier Fällen konnten die Patienten mit ihren Familien schließlich nicht in die Fallsammlung aufgenommen werden, weil die Einschlusskriterien nicht erfüllt wurden (s. Material und Methoden, Tabelle 4).

Von den insgesamt 21 untersuchten Patienten wiesen 19 Patienten selbst ein Pankreaskarzinom auf (Indexpatienten). Davon können 11 Patienten - und damit die Mehrheit – in die Gruppe des Familiären Pankreaskarzinoms eingeordnet werden, sieben Patienten zum Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom und drei Patienten zum Familiären atypischen multiplen Muttermal und Melanom-Syndrom.

Zwei Patienten wiesen selbst ein malignes Melanom auf und gehören somit in die Gruppe des Pankreaskarzinom-Melanom-Syndroms.

3.3.1. Familiäres Pankreaskarzinom

In der Gruppe der Patienten mit Familiärem Pankreaskarzinom fand sich bei 10 Patienten ein Verwandter 1° mit einem Pankreaskarzinom, und in einem Fall zwei Verwandte 1° mit einem Pankreaskarzinom.

Der jüngste Patient war bei Erstdiagnose 41 Jahre, der älteste Patient 65 Jahre alt.

Das Durchschnittsalter beträgt 57 Jahre.

In diesen Familien zeigten sich bei Verwandten 1° außerdem Lungenkarzinome (4 Fälle), Mammakarzinome (2 Fälle) und ein Lymphdrüsenkarzinom.

3.3.2. Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom

Von den insgesamt sieben Indexpatienten dieser Gruppe wiesen fünf ein Pankreaskarzinom und zwei ein malignes Melanom auf.

In der Gruppe der Patienten mit Pankreaskarzinom fanden sich in drei Fällen ein Verwandter 1° mit einem malignem Melanom und in zwei Fällen je zwei Verwandte 1° mit Pankreaskarzinom (da ein/e Nichte/Neffe der Indexpatienten ein malignes Melanom aufweisen liegt eine PKMS-Familie vor).

In der Gruppe der Patienten mit multiplem Melanom fanden sich in einem Fall ein Verwandter 1° mit Pankreaskarzinom und in einem Fall zwei Verwandte 1° mit Pankreaskarzinom.

Der jüngste Patient war bei Erstdiagnose 34 Jahre, der älteste Patient 68 Jahre alt.

Das Durchschnittsalter betrug 58,6 Jahre.

In diesen Familien zeigten sich bei Verwandten 1° außerdem ein Prostatakarzinom, ein Mammakarzinom, ein Gehirntumor und ein Magenkarzinom.

3.3.3. Familial Atypical Multiple-Mole-Melanoma-Syndrom

In der Gruppe der Patienten mit Familial Atypical Multiple-Mole-Melanoma-Syndrom fanden sich in einem Fall jeweils zwei Verwandte 1° mit Pankreaskarzinom und multiplen Naevi. In einem anderen Fall waren es ein Verwandter 1° mit malignem Melanom und vier 1° Verwandte mit multiplen Naevi. In einem dritten Fall fanden sich ein Verwandter 1° mit malignem Melanom und drei Verwandte 1° mit multiplen Naevi.

Der jüngste Patient war bei Erstdiagnose 45 Jahre, der älteste Patient 67 Jahre alt.

Das Durchschnittsalter betrug 57,3 Jahre.

In einer dieser Familien zeigte sich bei einem Verwandten 1° außerdem ein Prostatakarzinom.

3.3.4. Indexpatient mit der Mutation Q50X

Die von der Mutation Q50X betroffene Patientin fand sich in der Gruppe des Pankreaskarzinom-Melanom-Syndroms. Bei Erstdiagnose ihres Pankreaskarzinoms war sie 55 Jahre alt und damit im Vergleich zu den anderen Patienten in ihrer Gruppe am jüngsten. Ihr Vater verstarb bereits mit 52 Jahren an den Folgen eines Malignen Melanoms und ihre Mutter mit 45 Jahren an den Folgen eines Magenkarzinoms (Abb. 10).

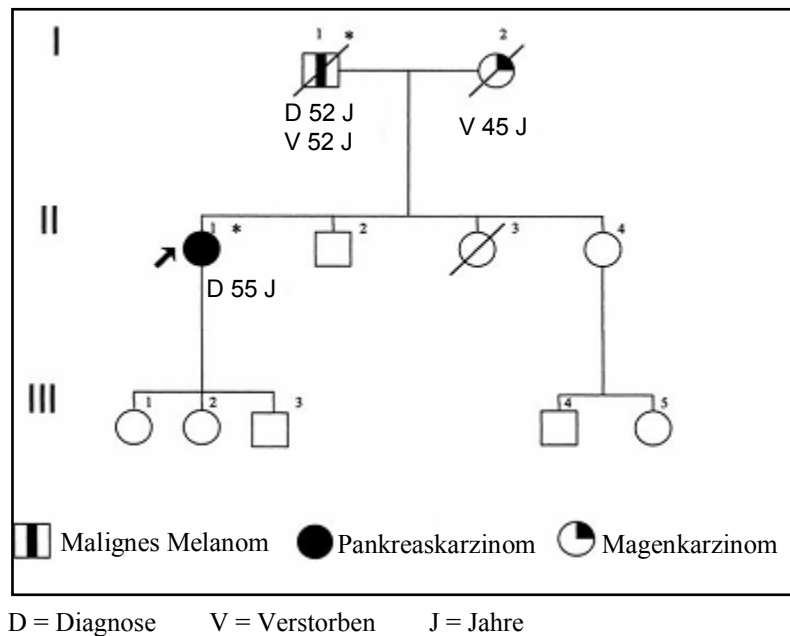


Abbildung 10: Stammbaum des Indexpatienten.

4. Diskussion

4.1. Die alternative Splicevariante des CDKN2A-Genlocus: p12

1999 untersuchten Robertson und Jones die Expression von $p16^{INK4A}$ und $p14^{ARF}$ in humanem- (Abb. 11) und murinem Gewebe (Abb. 12). Sie fanden heraus, dass beide Translationsprodukte in geringen Mengen sowohl in humanem als auch in murinem Gewebe exprimiert werden. Eine Ausnahme unter den Geweben fiel jedoch auf: das Pankreas. Im Gegensatz zu den anderen Geweben konnte in der Gelelektrophorese keine $p14^{ARF}$ mRNA, jedoch eine hohe Menge an $p16^{INK4A}$ mRNA nachgewiesen werden. Zusätzlich exprimiert das humane Pankreas eine bis dato nicht bekannte Splicevariante des INK4a – Locus: p12 (Abb. 11, mittleres Feld).

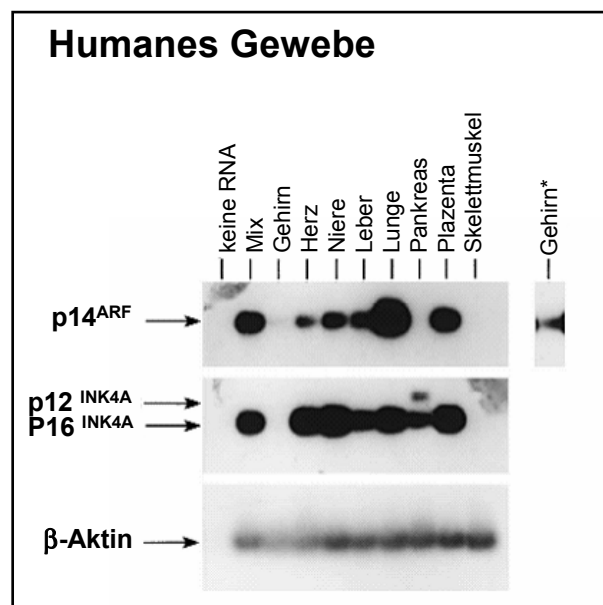


Abbildung 11: Expression von $p16^{INK4A}$, $p12^{INK4A}$ und $p14^{ARF}$ in humanem Gewebe.

cDNA Bibliotheken (Clontech) aus normalem humanem Gewebe wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von $p14^{ARF}$ (oben), $p16^{INK4A}$ (mitte) und β -Aktin (unten) untersucht. $p14^{ARF}$ und $p16^{INK4A}$ wurden mit einer spezifischen Oligonukleotidprobe des 1. Exons hybridisiert. „Mix“ ist ein Gemisch aus der cDNA von allen Geweben. Nach Hybridisierung konnte im Gehirngewebe (Gehirn*) eine geringe Menge von $p14^{ARF}$ mRNA nachgewiesen werden. Auch nach längerer Hybridisierung konnte $p14^{ARF}$ nicht im Pankreas und Skelettmuskel und $p16^{INK4A}$ nicht im Gehirn und Skelettmuskel nachgewiesen werden (modifiziert nach Robertson und Jones, 1999).

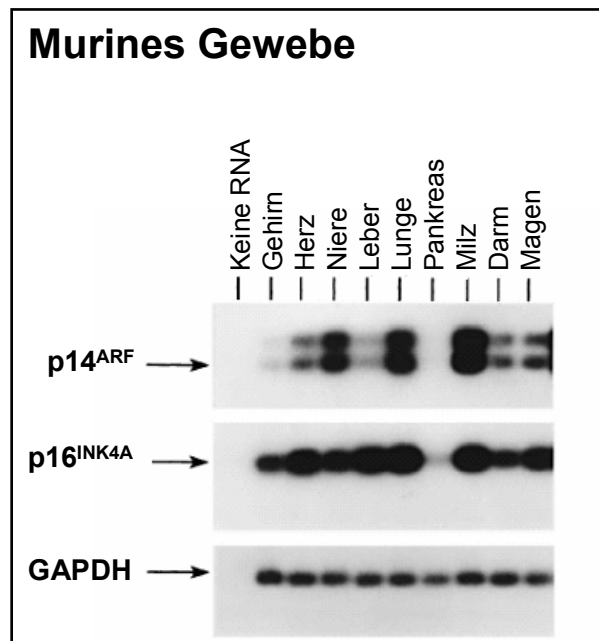


Abbildung 12: Expression von p14^{ARF} und p16^{INK4A} in murinem Gewebe.

Normales murines Gewebe wurde mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von p14^{ARF} (oben), p16^{INK4A} (mitte) und GAPDH (unten) untersucht und mit murinem, spezifischen Oligonukleotidproben hybridisiert. Die zusätzliche Bande die p14^{ARF} zeigt, wurde zuvor bereits nachgewiesen (Quelle *et al.*, 1995). Das Klonen und Sequenzieren dieser Bande deckte auf, dass sie kein Bezug zu p14^{ARF} hatte. p16^{INK4A} mRNA konnte in murinem Pankreasgewebe in geringeren Mengen als in anderen Geweben festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte p14^{ARF} mRNA nicht im murinem Pankreasgewebe nachgewiesen werden (modifiziert nach Robertson und Jones, 1999).

Das p12-Transkript entsteht durch die Verwendung einer alternativen „splice donor site“ innerhalb des Intron 1 (Abb. 2, B). Es produziert ein 12 kDa großes Protein, bestehend aus INK4a Exon 1α und einem neuen C – Terminus (Abb. 2, B und 5). In Immunoprecipitationsstudien konnte keine Beeinflussung von CDK4 durch das neue Protein festgestellt werden, jedoch ist es fähig auf einer Retinoblastom – unabhängigen Weise das Zellwachstum zu unterdrücken.

Diese Tatsache konnte durch die Untersuchungen von Robertson und Jones bestätigt werden. Sie transfizierten einen p12-Expressionsvektor in eine PANC-1 Zelllinie, die den Wildtyp von pRb exprimiert, in welcher jedoch der INK4a/ARF-Locus deletiert wurde (Schutte *et al.*, 1997) und in eine C-33A Zelllinie, die INK4a exprimiert, nicht jedoch pRb (Hara *et al.*, 1996). Die Expression von p12 unterdrückt das Wachstum der C-33A-Zellen zu 40% und der PANC-1 Zellen zu 60%.

Die Transfektion eines INK4a-Expressionsvektors diente als positiv-Kontrolle für die Wachstumshemmung in PANC-1- Zellen. Die Wiedereinführung von INK4a induziert daher die Wachstumskontrolle in diesen Zellen. Daraus resultierte eine nahezu 80%ige Reduktion der Zellanzahl. Die Transfektion von INK4a in die C-33A-Zellen diente als negativ-Kontrolle für die Wachstumshemmung, da diese Zellen eine Mutation für pRb aufweisen und bereits in hohem Maße INK4a exprimieren. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte kein signifikanter suppressiver Effekt für die INK4a-exprimierenden C-33A-Zellen erkannt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Immunoprecipitationsstudien überein und zeigen, dass p12 vermutlich auf einer Retinoblastom – unabhängigen Weise das Zellwachstum zu unterdrücken vermag.

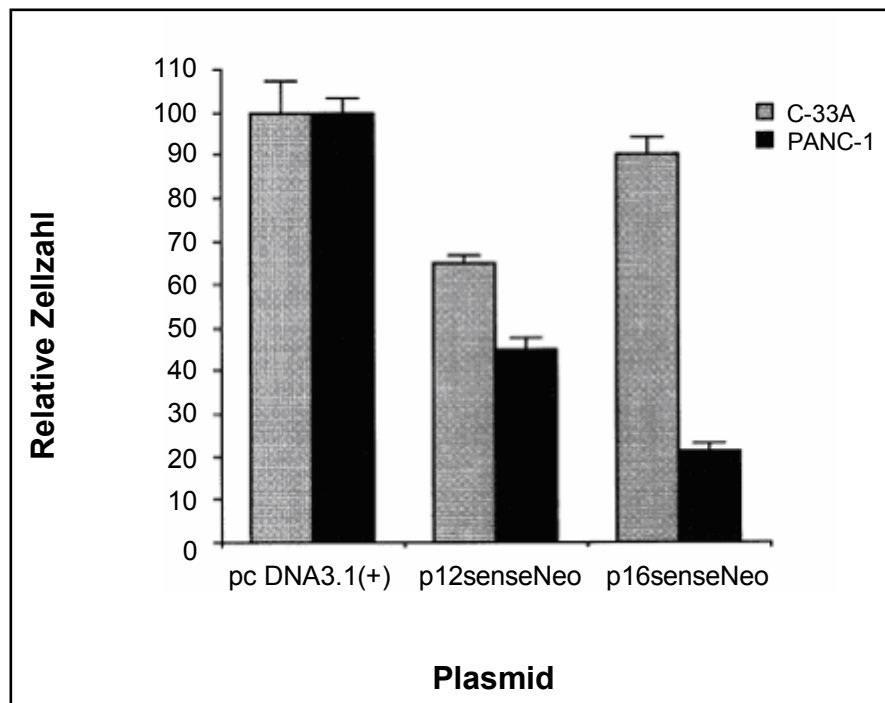


Abbildung 13: Prüfung der Wachstumshemmung.

PANC-1-Zellen (Wildtyp pRb (Schutte *et al.*, 1997), dunkle Balken) und C-33A-Zellen (mutiertes pRb (Hara *et al.*, 1996), helle Balken) wurden mit den angegebenen Expressionsvektoren transfiziert und für 12 Tage mit G418 selektiert.

Das Ergebnis, dass der CDKN2A-Locus gewebespezifisch für drei verschiedene Transkripte kodiert, könnte wichtige Auswirkungen auf die Diagnostik von hereditärem Pankreaskarzinom haben, einer der Tumorerkrankungen, bei dem dieses Gen nahezu immer von einer Inaktivierung betroffen ist.

Da p12 ausschließlich pankreasspezifisch exprimiert wird, war das Ziel dieser Arbeit diese alternative Spleißvariante des p16^{INK4A}-Gens auf Konstitutionelle Mutationen zu untersuchen.

4.2. Die nonsense Mutation Q50X im p12-Gen

Durch Sequenzanalysen konnte bei einem der 25 in dieser Arbeit untersuchten Indexpatienten die „nonsense Mutation“ c.148 C>T (Q50X) nachgewiesen werden. Die betroffene Indexpatientin entwickelte im Alter von 55 Jahren ein Pankreaskarzinom, dieselbe Mutation konnte bei Ihrem Vater, der mit 52 Jahren ein malignes Melanom entwickelte, identifiziert werden (Bartsch *et al.*, 2002). Die betroffenen Familienmitglieder zeigten keine phänotypisch charakteristischen Merkmale des FAMMM-Syndroms. In dieser Familie handelte es sich aufgrund des Zusammentreffens von Melanom und Pankreaskarzinom in Verbindung mit einer konstitutionellen Mutation von p16^{INK4A} um ein Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom.

4.2.1. Lokalisation der Mutation Q50X

Die Mutation ist in dem Bereich von Exon 1α des CDKN2A-Genlocus lokalisiert, der für beide Splicevarianten, p12^{INK4A} und p16^{INK4A}, benötigt wird (Abb. 2, 5, 9). Aus diesem Grund ist diese im Rahmen der p16^{INK4A}-Mutationssuche bereits identifiziert worden (Tanaka *et al.*, 1997; Betticher *et al.*, 1997).

Im weiteren Abschnitt von Exon 1α des CDKN2A-Genlocus, der ausschließlich für die Splicevariante p12^{INK4A} verwendet wird, konnte bei allen 25 untersuchten Patienten keine weitere Mutation festgestellt werden.

4.2.2. Bedeutung der Mutation Q50X im p12-Gen

Das p16^{INK4A}-Gen ist bei 27-95% der sporadischen duktaalen Pankreaskarzinome inaktiviert (Caldas *et al.*, 1994; Bartsch *et al.*, 1995; Naumann *et al.*, 1996).

Davon betreffen etwa 40% Mutationen eines Allels mit zusätzlichem Verlust des zweiten Allels, in weiteren 40% liegen homozygote Deletionen vor und bei etwa 15% findet man eine Hypermethylierung des p16^{INK4A}-Promotors (Schutte *et al.*, 1997).

Außerdem konnten bei 12-15% der sporadischen Melanome somatische p16^{INK4A}-Alterationen identifiziert werden.

Die auf der Knudson-Hypothese basierende Vermutung, dass p16^{INK4A}-Alterationen ebenfalls beim familiären Pankreaskarzinom und Melanom eine Rolle spielen, konnte bestätigt werden (Knudson, 1971).

Bei einem Großteil der bisher beschriebenen Familien mit FAMMM-Syndrom konnten tumorauslösende Keimbahnmutationen im p16^{INK4A}-Tumorsuppressorgen identifiziert werden. 25% der FAMMM-Familien zeigen zusätzlich ein Pankreaskarzinom und bei 12% der Familien mit familiärem Pankreaskarzinom ist ein FAMMM-Phänotyp beschrieben (Goldstein *et al.*, 1995; Whelan *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 2002). In familiären Pankreaskarzinom-Familien, die nicht mit Melanomen assoziiert sind wurden bisher keine CDKN2A-Keimbahnmutationen identifiziert.

Goldstein *et al.* berichteten von 17 Melanom-Familien mit einer konstitutionellen Mutation von p16^{INK4A}, wovon lediglich 6 Familien zumindest ein Fall von Pankreaskarzinom aufwiesen. Die Mutationen G101W und V126D kamen in den Familien mit und ohne Pankreaskarzinom vor (Goldstein *et al.*, 2000). Borg *et al.* untersuchten Angehörige von 52 Familien in denen zwei oder mehr Fälle von Melanomen aufgetreten waren, auf CDKN2A-Mutationen. Neun von zehn Familien mit einer p16^{INK4A}-Mutation zeigten eine identische Insertion von Arginin an Position 113 des Proteins. Innerhalb der neun Familien fanden sich wiederum neun Patienten aus sechs Familien mit einem Pankreaskarzinom. In den anderen drei Familien konnten keine Pankreaskarzinome festgestellt werden (Borg *et al.*, 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die Prädisposition in manchen Familien ein Pankreaskarzinom zu entwickeln mit einer Mutation im CDKN2A-Tumorsuppressorgen assoziiert ist. In diesem speziellen Fall handelte es sich bei der Patientin mit der „nonsense Mutation“ c.188 C>T, Q50X und ihrer Familie um ein Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom, einer speziellen Subgruppe von FAMMM-Syndrom, da die Familienmitglieder keine phänotypisch charakteristischen Merkmale des FAMMM-Syndroms zeigten.

In der nationalen Fallsammlung für familiäres Pankreaskarzinom wurde eine weitere Mutation des CDKN2A-Tumorsuppressorgens bei einem Patienten mit Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom entdeckt: Die „frameshift Mutation“ c.323-324insG, E119X (Bartsch *et al.*, 2002). Auch in diesem Fall zeigten die Familienmitglieder keine phänotypisch charakteristischen Merkmale des FAMMM-Syndroms.

Im Gegensatz dazu wiesen alle von Lynch *et al.* untersuchten Patienten aus acht Familien, die an einem Pankreaskarzinom oder einem malignem Melanom mit einer entsprechenden p16^{INK4A}-Mutation erkrankten, einen FAMMM-Phänotyp auf (Lynch *et al.*, 2002).

Dies unterstreicht das Vorhandensein einer speziellen Form bzw. Untergruppe des FAMMM-Syndroms: das Pankreaskarziom-Melanom-Syndrom (auch PKMS, PCMS, FAMMM-PC).

In beiden Familien wiesen sowohl die Indexpatienten, als auch Ihre Väter, die gleiche Mutation auf. Da in einem Fall die Indexpatientin von einem Pankreaskarzinom und ihr Vater von einem malignem Melanom betroffen war und sich die Situation im anderen Falle umgekehrt darstellte, ist es nicht möglich vom Genotyp auf den sich entwickelnden Phänotyp zu schließen. Die Frage warum der Träger einer speziellen p16^{INK4A}-Mutation entweder an einem malignen Melanom, einem Pankreaskarzinom oder in sehr seltenen Fällen an beidem erkrankt bleibt zum jetzigen Zeitpunkt noch unbeantwortet. Ob überhaupt eine direkte genotypisch-phänotypische Beziehung bei speziellen p16^{INK4A}-Mutation und Pankreaskarzinom besteht, stellt auch die Entdeckung von drei Mutationen (V126D, G101W, H66del19) in Frage, die bei Melanomfamilien mit und ohne Pankreaskarzinom vorkamen (Lynch *et al.*, 1968; Ciotti *et al.*, 1996).

Diese Studien zeigen, dass in den PKMS - Familien neben der Art der Mutation des CDKN2A-Gens auch andere genetische- oder exogene Faktoren zu der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms führen können.

Von den Hochrisikopersonen in Pankreaskarzinomfamilien entwickeln Raucher in etwa zehn Jahre früher ein Pankreaskarzinom als Nichtraucher (Rulyak *et al.*, 2001).

Weder die Trägerin der Mutation Q50X, noch der Patient aus den Untersuchungen der nationalen Fallsammlung mit der Mutation E119X waren Raucher.

Das Alter bei Diagnose der Pankreaskarzinompatienten in den PKMS-Familien war mit 52 und 55 Jahren um ca. 15 Jahre jünger als in der gesamten deutschen Bevölkerung. Mit Sicherheit kann man keine Schlüsse aus nur zwei Patientendaten ziehen, jedoch kann Lynch *et al.* ein frühes Auftreten von Pankreaskarzinomen in sechs von acht untersuchten FAMMM-PC bestätigen (Lynch *et al.*, 2002). Die Daten des FaPaCa-Projektes zeigen ein ähnliches Bild für das Alter bei Erkrankung eines Malignen Melanoms in Familien mit p16^{INK4A}-Mutationen. Hier liegt der Median bei 45 Jahren im Gegensatz zur Allgemeinbevölkerung mit einem Median von 55 Jahren (Goldstein *et al.*, 1997).

4.2.3. Fehlende Bedeutung von p12-Mutationen beim familiären Pankreaskarzinom

Keiner der 11 untersuchten Patienten mit einem familiären Pankreaskarzinom wies eine Mutation im p12-Gen auf. Dies gilt auch für die bisherigen Untersuchungen von p16 des CDKN2A-Genlocus. Keiner der 18 bis dato molekulargenetisch untersuchten Indexpatienten mit Familiären Pankreaskarzinom aus der nationalen Fallsammlung wies eine konstitutionelle Mutation von p16^{INK4A} auf (Bartsch *et al.*, 2002).

Dies lässt auf eine seltene oder sogar fehlende Assoziation von familiärer Akkumulation eines Pankreaskarzinoms und einer CDKN2A-Keimbahnmutation schließen. Der zugrundeliegende Gendefekt ist weiterhin Inhalt der aktuellen Forschung.

4.2.4. p12-Mutation und ihre Bedeutung für die Zukunft

Das Ausmaß der Fallzahl beruht auf der gering verfügbaren Anzahl der Patienten mit hereditären Pankreaskarzinom und deren DNA. Aufgrund dessen ist es sicherlich nicht möglich mit letzter Sicherheit eine fakultativ bestehende p12-Mutation beim familiären

Pankreaskarzinom und weitere p12-Mutationen beim Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom auszuschließen.

Doch trotz der geringen Fallzahlen dieser Patienten ist es mit Sicherheit oberste Priorität eine Mutationsanalyse von p16^{INK4A} beim FAMMM- und Pankreaskarzinom-Melanom-Syndrom durchzuführen um die betroffenen als Hochrisikopatienten zu erkennen, sie in eine genetische Beratung einzubinden und in ein Früherkennungsprogramm zu integrieren. Damit könnte in Zukunft bei vielen Patienten bereits ein sehr frühes Tumorstadium des Pankreaskarzinom oder des malignen Melanoms entdeckt und behandelt werden. Dadurch könnte die bisherige 5-JÜR von 40% bei Pankreaskarzinompatienten weiter angehoben werden und die Mortalität weiter sinken.

4.3. Hochrisikopatienten und genetische Beratung

Gerade aufgrund der sehr niedrigen Fallzahlen von familiären Pankreaskarzinomen, sind überregionale Tumorregister, wie die nationale Fallsammlung für familiäres Pankreaskarzinom der deutschen Krebshilfe von größter Bedeutung. Die Rekrutierung der Patienten wird durch das hohe Erkrankungsalter, den kurzen Krankheitsverlauf und verstrichene Aufbewahrungsfristen von Krankenunterlagen erschwert (Bartsch *et al.*, 2001). Die nationale Fallsammlung für familiäres Pankreaskarzinom soll die epidemiologischen und genetischen Ursachen des familiären Pankreaskarzinoms erforschen. Bei Verdacht auf ein mit einem Pankreaskarzinom assoziiertem Tumorsyndrom, sollte der Patient einem entsprechenden Facharzt zugeführt werden, um die Diagnose zu sichern. Anhand des familiären Krankheitsbildes wird das persönliche Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln individuell abgewägt. Präzisiert wird das individuelle Risiko der Familienangehörigen durch die Suche nach Keimbahnmutationen in bekannten Prädispositionsgenen. Da dies mit erheblichen klinischen, psychischen, sozialen und versicherungsrechtlichen Auswirkungen verbunden sein kann, ist die parallele Einbindung in eine interdisziplinäre Beratung und Betreuung obligat (Bundesärztekammer, 1998). Eine BRCA2-Mutationsanalyse sollte allen FPC-Familien angeboten werden, wohingegen eine Mutationsanalyse des CDKN2a-, PRSS1-, STKB1-Gens oder der Mismatchrepairene nur bei Hinweis eines entsprechenden Tumorsyndroms indiziert ist. Die Abschätzung des Risikos ein Pankreaskarzinom zu entwickeln bei entsprechenden Mutationen, wird durch kleine

Fallzahlen der bisherigen Untersuchungen, die vorwiegend retrospektiv erhoben wurden, zusätzlich erschwert. Eine Verzerrung durch Selektion kann somit nicht ausgeschlossen werden. Risikodaten für die Gesamtbevölkerung sind derzeit nicht präsent, weshalb auch die tatsächliche Penetranz des Pankreaskarzinoms innerhalb bestimmter Mutationen nicht bekannt ist. Ob und in welchem Ausmaß andere genetische und nicht-genetische Faktoren die Ätiologie des familiären Pankreaskarzinoms mit bedingen ist bisher ungeklärt. (Lynch *et al.*, 2000).

4.4. Früherkennungsprogramm

Eine weitere Intension dieser Fallsammlung ist es, Hochrisikopatienten zu identifizieren um sie einem Früherkennungsprogramm zuzuführen. Zu der Gruppe der Hochrisikopatienten zählen alle Angehörigen die maximal fünf Jahre jünger sind als ein erstgradig Verwandter mit Pankreaskarzinom aus einer FPC-Familie oder mindestens 45 Jahre alt sind. Außerdem Personen mit einer Keimbahnmutation, die mit einem deutlich erhöhten Risiko für ein Pankreaskarzinom einhergeht. Das Früherkennungsprogramm wird den Hochrisikopersonen bei Aufnahme in die Fallsammlung empfohlen und umfasst eine jährliche Anamnese, körperliche Untersuchung, MRT des Pankreas mit MRCP und eine CA 19-9-Bestimmung (engl. "cancer antigen" = Krebsantigen) (Gerdes *et al.*, 2002).

Jedoch existieren derzeit keine zuverlässigen diagnostischen Verfahren oder Marker zur Früherkennung von Präkanzerosen bzw. kleinen Tumoren (Durchmesser <1cm). Allerdings konnte mit einer prospektiven Überwachung von 35 Hochrisikopatienten aus 13 FPC-Familien im Rahmen eines Früherkennungsprogramms ein möglicher Vorteil dieser Patienten erreicht werden. Das Früherkennungsprogramm beinhaltete eine endoskopische Sonographie (EUS), eine endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) sowie die Bestimmung der Tumormarker CA19-9 und CEA (engl. "carcino-embryonic antigen" = karzinoembryonales Antigen). Bei 12 der 35 Personen wurde eine totale Pankreatektomie aufgrund des Verdachtes von Pankreasdysplasien durchgeführt. Alle 12 Patienten zeigten im Pankreaspräparat weitgestreute Dysplasien, die zwischen atypischer duktaler Hyperplasie und Carcinoma in situ variierten (Pankreatische intraepitheliale Neoplasien Grad 2 und 3). In dem

Nachbeobachtungszeitraum von vier Jahren entwickelte keiner der Patienten ein Karzinom bzw. Metastasen, noch verstarb einer dieser Patienten (Rulyak *et al.*, 2001).

6. Literaturverzeichnis

Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., Perucho, M. 1988. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53(4): 549-554.

Apple, S. K., Hecht, J. R., Lewin, D. N., Jahromi, S. A., Grody, W. W., Nieberg, R. K. 1999. Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Pathol* 30(2): 123-129.

Banke, M. G., Aston, C. E., McNamara, P. J., Crowley, K. E., Mulvihill, J. J. The Family Study of Pancreatic Cancer group. 1997. Segregation analysis of pancreatic cancer. *Genet. Epidemiol.* 14: 519, A6.

Barton, C. M., Staddon, S. L., Hughes, C. M., Hall, P. A., O'Sullivan, C., Kloppel, G., Theis, B., Russell, R. C., Neoptolemos, J., Williamson, R. C. 1991. Abnormalities of the p53 tumour suppressor gene in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 64: 1076-1082.

Bartsch, D. K., Goodfellow, P. J., Whelan, A. J. 1995. A new familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma associated with mutation in CDKN2. *American Journal of Human Genetics (Suppl)* 57: A24.

Bartsch, D. K., Shevlin, D. W., Tung, W. S., Kisker, O., Wells, S. A. Jr., Goodfellow, P. J. 1995. Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 14: 189-195.

Bartsch, D. K. und Rothmund, M. 2001. Familiäres Pankreaskarzinom in Hereditären Tumorerkrankungen, D. Ganten und K. Ruckpaul, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 401-422.

Bartsch, D. K., Sina-Frey, M., Ziegler, A., Hahn, S. A., Przypadlo, E., Kress, R., Gerdes, B., Rieder, H. 2001. Update of familial pancreatic cancer in Germany. *Pancreatology* 1(5): 510-516.

Bartsch, D. K., Sina-Frey, M., Lang, S., Wild, A., Gerdes, B., Barth, P., Kress, R., Grützmann, R., Colombo-Benkman, M., Ziegler, A., Hahn, S. A., Rothmund, M., Rieder, H. 2002. CDKN2A germline mutations in familial pancreatic cancer. *Annals of Surgery*: 236(6): 730-737.

Bartsch, D. K., Kress, R., Sina-Frey, M., Grutzmann, R., Gerdes, B., Pilarsky, C., Heise, J. W., Schulte, K. M., Colombo-Benkman, M., Schleicher, C., Witzigmann, H., Pridohl, O., Ghadimi, M. B., Horstmann, O., von Bernstorff, W., Jochimsen, L., Schmidt, J., Eisold, S., Esteyez-Schwarz, L., Hahn, S. A., Schulmann, K., Bock, W., Gress, T. M., Zugel, N., Breitschaft, K., Prenzel, K., Messmann, H., Endlicher, E., Schneider, M., Ziegler, A., Schmiegel, W., Schäfer, H., Rothmund, M., Rieder, H. 2004. Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. *Int. J. Cancer* 110(6): 902-906.

Bergman, W., Watson, P., Jong, J. de, Lynch, H. T., Fusaro, R. M. 1990. Systematic cancer and the FAMMM syndrome. *Br. J. Cancer* 61: 932-936.

Bergman, W. and Gruis, N. A. 1996. Letter to the Editor. *N Engl J Med* 334: 471.

Betticher, D. C., White, G. R. M., Vonlanthen, S., Liu, X., Kappeler, A., Altermatt, H. J., Thatcher, N., Heighway, J. 1997. G1 control gene status is frequently altered in resectable non-small lung cell cancer. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 74: 556-562.

Boardman, L. A., Thibodeau, S. N., Schaid, D. J., Lindor, N. M., McDonnell, S. K., Burgart, L. J., Ahlquist, D. A., Podratz, K. C., Pittelkow, M., Hartmann, L. C. 1998. Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome. *Ann. Intern. Med.* 128: 896-899.

Borg, A., Sandberg, T., Nilsson, K., Johannsson, O., Klinker, M., Mäsback, A., Westerdahl, J., Olsson, H., Ingvar, C. 2000. High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst* 92: 1260–1266.

Boschman, C. R., Stryker, S., Reddy, J. K., Rao, M. S. 1994. Expression of p53 protein in precursor lesions and adenocarcinoma of human pancreas. *Am J Pathol* 145: 1291-1295.

Boveri, T. 1914. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Jena: Gustav Fischer Verlag.

Bretnall, T. A., Bronner, M. P., Byrd, D. R., Haggitt, R. C., Kimmey, M. B. 1999. Early diagnosis and treatment of pancreatic dysplasia in patients with a family history of pancreatic cancer. *Ann. Intern. Med.* 131: 247-255.

Bueno de Mesquita, H. B., Maisonneuve, P., Moerman, C. J., Walker, A. M. 1992. Aspects of medical history and exocrine carcinoma of the pancreas: a population-based case-control study in the Netherlands. *Int. J. Cancer* 52(1): 17-23.

Bundesärztekammer. 1998. Richtlinien zur Diagnostik der genetischen Disposition für Krebserkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt* 95, Ausgabe 22, Seite A-1396 / B-1164 / C-1088.

Caldas, C., Hahn, S. A., Da Costa, L. T., Redston, M. S., Schutte, M., Seymour, A. B., Weinstein, C. L., Hruban, R. H., Yeo, C. J., Kern, S. E. 1994. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8(1): 27-32.

Chappuis, P. O., Ghadirian, P., Foulkes, W. D. 2001. The role of genetic factors in the etiology of pancreatic adenocarcinoma: an update. *Cancer Investigations (New York)*: 19(1): 65-75.

Ciotti, P., Stringini, P., Bianchi-Scarra, G. 1996. Familial melanoma and pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 334: 469-470.

Coleman, W. B. and Tsongalis, G. J. 1995. Multiple mechanisms account for genomic instability and molecular mutation in neoplastic transformation. *Clin Chem.* 41(5): 644-57. Review.

Comfort, M. W. and Steinberg, A. G. 1952. Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology* 21: 54-63.

Cooperman, A. M. 2001. Pancreatic cancer: the bigger picture. *Surg Clin North Am* 81: 557-574.

Danes, B. S. and Lynch, H. T. 1982. A familial aggregation of pancreatic cancer: an in vitro study. *JAMA* 247: 2798-2802.

Dat, N. M. and Sontag, S. J. 1982. Pancreatic carcinoma in brothers. *Ann. Intern. Med.* 97: 282.

DiGiuseppe, J. A., Hruban, R. H., Offerhaus, G. J., Clement, M. J., van den Berg, F. M., Cameron, J. L., van Mansfeld, A. D. 1994. Detection of K-ras mutation in mucinous duct hyperplasia from a patient with a family history of pancreatic carcinoma. *Am. J. Pathol.* 144: 889-895.

Ehrenthal, D., Haeger, L., Griffin, T., Compton, C. 1987. Familial pancreatic adenocarcinoma in three generations: a case report and review of the literature. *Cancer* 59: 1661-1664.

Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B., Herman, J. G. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 61(8): 3225-3229.

Evan, G. I. and Vousden, K. H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348.

Evans, J. P., Burke, W., Chen, R., Bennett, R. L., Schmidt, R. A., Dellinger, E. P., Kimmey, M., Crispin, D., Brentnall, T. A., Byrd, D. R. 1995. Familial pancreatic adenocarcinoma: association with diabetes and early molecular diagnosis. *J Med Genet.* 32(5): 330-335.

Everhart, J. and Whright, D. 1995. Diabetes mellitus as risk factor for pancreatic cancer. *JAMA* 273: 1605-1609.

Falk, R. T., Pickle, L. W., Fontham, E. T., Correa, P., Fraumeni, J. F. 1988. Life-style risk factors for pancreatic cancer in Louisiana: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 128: 324-336.

Fearon, E. R. and Vogelstein B. 1993. Tumor suppressor genes and cancer. *Cancer Medicine*, third edition; Holland, J. F., Frei, E., Bast, R. C., Kufe, D. W, Morton, D. L., Weichselbaum, R. R. (eds.). Lea and Febiger, Philadelphia, London: 77-90.

Frank, T. S., Deffenbaugh, A. M., Reid, J. E., Hulick, M., Ward, B. E., Lingenfelter, B., Gumpfer, K. L., Scholl, T., Tavtigian, S. V., Pruss, D. R., Critchfield, G. C. 2002. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10.000 individuals. *J. Clin. Oncol.* 20: 1480-1490.

Friedman, G. D. and van den Eeden, S. K. 1993. Risk factors for pancreatic cancer: an exploratory study. *Int. J. Epidemiol.* 22 : 30-37.

Friedman, J. M. and Fialkow, P. J. 1974. Carcinoma of the pancreas in four brothers. *Birth Defects* 12: 145-150.

Gebhardt, C., Meyer, W., Reichel, M., Wunsch, P. H. 2000. Prognostic factors in the operative treatment of ductal pancreatic carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 385: 14-20.

Gerdes, B., Kreß, R., Rieder, H., Sina-Frey, M., Przypadlo, E., Barth, P., Rehder, H., Hahn, S. A., Schmiegel, W., Rothmund, M., Ziegler, A., Bartsch, D. K. 2002. Familiäres Pankreaskarzinom – Studienkonzept einer Nationalen Fallsammlung mit Früherkennungsprogramm für Hochrisikopatienten.

Ghadirian, P., Boyle, P., Simard, A., Baillargeon, J., Maisonneuve, P., Perret, C. 1991. Reported family aggregation of pancreatic cancer within a population-based case-control study in the Francophone community in Montreal, Canada. *Int. J. Pancreatol.* 10 (3-4): 183-196.

Giardiello, F. M., Welsh, S. B., Hamilton, S. R., Offerhaus, G. J., Gittelsohn, A. M., Booker, S. V., Krush, A. J., Yardley, J. H., Luk, G. D. 1987. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N. Engl. J. Med.* 316: 1511-1514.

Goldstein, A. M., Fraser, M. C., Struewing, J. P., Hussussian, C. J., Ranade, K., Zametkin, D. P., Fontaine, L. S., Organic, S. M., Dracopoli, N. C., Clark, W. H. Jr. 1995. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. *N. Engl. J. Med.* 333: 970-974.

Goldstein, A. M., Struewing, J. P., Chidambaram, A., Fraser, M. C., Tucker, M. A. 2000. Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst.* 21; 92(12): 1006-1010.

Gorry, M. C., Gabbaizedeh, D., Furey, W., Gates, L. K. Jr., Preston, R. A., Aston, C. E., Zhang, Y., Ulrich, C., Ehrlich, G. D., Whitcomb, D. C. 1997. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 113: 1063-1068.

Grajower, M. M. 1983. Familial pancreatic cancer. *Ann. Intern. Med.* 98: 111.

Gruis, N. A., Sandkuijl, L. A., Velden, P. A. van der, Bergmann, W., Frants, R. R. 1995. CDKN2 explains part of the clinical phenotype in Dutch familial atypical multiple-mole melanoma (FAMMM) syndrome families. *Melanoma Res* 5: 169-177.

Gruis, N. A., Velden, P. A. van der, Sandkuijl, L. A., Bergmann, W., Frants, R. R. 1995. Homozygotes for the CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat Genet* 10: 351-353.

Gullo, L., Pezzilli, R., Morselli-Labate, A. M., the Italian Pancreatic Cancer Group. 1994. Diabetes and the risk of pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 331: 81-84.

Haber, D. and Harlow, E. 1997. Tumor suppressor genes: evolving definition in the genomic age. *Nat. Genetics* 16: 320-322.

Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H., Kern, S. E. 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350.

Hahn, S. A., Greenhalf, B., Ellis, I., Sina-Frey, M., Rieder, H., Korte, B., Gerdes, B., Kress, R., Ziegler, A., Raeburn, J. A., Campra, D., Grutzmann, R., Rehder, H., Rothmund, M., Schmiegel, W., Neoptolemos, J. P., Bartsch, D. K. 2003. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 95(3): 214-221.

Hannon, G. J. and Beach, D. 1994. p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371: 257-261.

Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., Peters, G. 1996. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* 16(3): 859-867.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387(6630): 296-299.

Herman, J. G., Jen, J., Merlo, A., Baylin, S. B. 1996. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res.* 56(4): 722-727.

Hizawa, K., Iida, M., Matsumoto, T., Kohrogi, N., Kinoshita, H., Yao, T., Fujishima, M. 1993. Cancer in Peutz-Jeghers syndrome. *Cancer* 72: 2777-2781.

Howes, N., Greenhalf, W., Lerch, M., Deviere, J., O'Donnell, M., Ellis, I., Mountford, R., Neoptolemos, J. P. 2000. Pancreatic cancer risk in hereditary pancreatitis in Europe. Consortium of EUROPAC. *Digestion* 61: 300.

Hruban, R. H., van Mansfeld, A. D., Offerhaus, G. J., van Weering, D. H., Allison, D. C., Goodman, S. N., Kensler, T. W., Bose, K. K., Cameron, J. L., Bos, J. L. 1993. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143(2): 545-554.

Hruban, R. H., Petersen, G. M., Ha, P. K., Kern, S. E. 1998. Genetics of pancreatic cancer: from genes to families. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 7: 1-23.

Hruban, R. H., Wilentz, R. E., Kern, S. E. 2000. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* 156: 1821-1825.

Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Kloppel, G., Longnecker, D. S., Luttges, J., Offerhaus, G. J. 2001. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 25(5): 579-586.

Hussussian, C. J., Struewing, J. P., Goldstein, A. M., Higgins, P. A., Ally, D. S., Sheahan, M. D., Clark Jr, W. H., Tucker, M. A., Dracopoli, N. C. 1994. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat. Genet.* 8: 15-21.

Hyvarinen, H. and Partanen, S. 1987. Association of cholecystectomy with abdominal cancers. *Hepatogastroenterology* 34: 280-284.

Ishii, K., Nakamura, K., Ozaki, H., Yamada, N., Takeuchi, T. 1968. Epidemiologic problems of pancreatic cancer. *Jpn. J. Clin. Med.* 26: 1839-1842.

Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A., Ward, E., Thun, M. J. Cancer Statistics 2003. *CA Cancer J Clin* 53(1): 5-26.

Jenne, D. E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Muller, O., Back, W., Zimmer, M. 1998. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat. Genet.* 18: 38-44.

Jick, H. and Dinan, B. J. 1981. Coffee and pancreatic cancer. *Lancet* 2: 92.

Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitian, S. V., Stockert, E., Day, R. S. 3rd, Johnson, B. E., Skolnick, M. H. 1994. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440.

Katkhouda, N. and Moviel, J. 1986. Pancreatic cancer in mother and daughter. *Lancet* 2: 747.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-57.

Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386 (6627): 761, 763.

Klein, G. 1993. *Oncogenes. Cancer Medicine*, third edition; Holland, J. F., Frei, E., Bast, R. C., Kufe, D. W, Morton, D. L., Weichselbaum, R. R. (eds.). Lea and Febiger, Philadelphia, London: 65-76.

Knudson, A. G. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 820-823.

Krammer, P. H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J., Debatin, K. M. 1994. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 279-289.

Kubbutat, M. H. G., Jones, S. N., Vousden, K. H. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387: 299-303.

Levine, A. J. 1995. The genetic origins of neoplasia. *JAMA* 273: 592.

Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 88(3): 323-331.

Li, F. P. and Fraumeni Jr, J. F. 1969. Soft tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: a familial syndrome? *Ann. Intern. Med.* 71: 747-752.

Liu, Q., Neuhausen, S., McClure, M., Frye, C., Weaver-Feldhaus, J., Gruis, N. A., Eddington, K., Allalunis-Turner, M. J., Skolnick, M. H., Fujimura, F. K. 1995. CDKN2 (MTS1) tumor suppressor gene mutations in human tumor cell lines. *Oncogene* 10(6): 1061-1067.

Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R. W., Lankisch, P. G., Andersen, J. R., Dimagno, E. P., Andren-Sandberg, A., Domellof, L. 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 328: 1433-1437.

Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., DiMagno, E. P., Elitsur, Y., Gates, L. K., Perrault, J., Whitcomb, D. C. 1997. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 442-446.

Lynch, H. T., Fitzsimmons, M. L., Smyrk, T. C., Lanspa, S. J., Watson, P., McClellan, J., Lynch, J. F. 1990. Familial pancreatic cancer: clinicopathologic study of 18 nuclear families. *Am J Gastroenterol* 85(1): 54-60.

Lynch, H. T., Fusaro, L., Lynch, J. F. 1992. Familial pancreatic cancer: a family study. *Pancreas* 7: 511-515.

Lynch, H. T., Smyrk, T. C., Watson, P., Lanspa, S. J., Lynch, J. F., Lynch, P. M., Cavalieri, R. J., Boland, C. R. 1993. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 104: 1535-1549.

Lynch, H. T. 1994. Genetics and pancreatic cancer. *Arch Surg.* 129 (3): 266-268. Review. Erratum in: *Arch Surg* 129(4): 455.

Lynch, H. T., Fusaro, L., Smyrk, T. C., Watson, P., Lanspa, S. J., Lynch, J. F. 1995. Medical genetic study of eight pancreatic cancer prone families. *Cancer Invest.* 13: 141-149.

Lynch, H. T., Smyrk, T., Kern, S. E., Hruban, R. H., Lightdale, C. J., Lemon, S. J., Lynch, J. F., Fusaro, L. R., Fusaro, R. M., Ghadirian, P. 1996. Familial pancreatic cancer: a review. *Semin Oncol.* 23(2): 251-275. Review.

Lynch, H. T., Brand, R. E., Lynch, J. F., Fusaro, R. M., Smyrk, T. C., Goggins, M., Kern, S. E. 2000. Genetic counseling and testing for germline p16 mutations in two pancreatic cancer-prone families. *Gastroenterology* 119(6): 1756-1760.

Lynch, H. T., Brand, R. E., Hogg, D., Deters, C. A., Fusaro, R. M., Lynch, J. F., Liu, L., Knezetic, J., Lassam, N. J., Goggins, M., Kern, S. 2002. Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer* 94: 84-96.

Lynch, H. T., Deters, C. A., Lynch, J. F. and Brand, R. E. 2004. Familial pancreatic carcinoma in Jews. *Familial Cancer* 3: 233-240.

Mack, T. M., Yu, M. C., Hanish, R., Henderson, B. E. 1986. Pancreas cancer and smoking, beverage consumption, and past medical history. *J. Natl. Cancer Inst.* 76: 49-60.

Magistrelli, P., Antinori, A., Crucitti, A., La Greca, A., Masetti, R., Coppola, R., Nuzzo, G., Picciocchi, A. 2000. Prognostic factors after surgical resection for pancreatic carcinoma. *J Surg Oncol* 74: 36-40.

Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni Jr, J. F., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A. 1990. Germline p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250: 1233-1238.

- Malumbres, M., Perez de Castro, I., Santos, J., Melendez, B., Manges, R., Serrano, M., Pellicer, A., Fernandez-Piqueras, J. 1997. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4b by deletion and de novo methylation with independence of p16INK4a alterations in murine primary T-cell lymphomas. *Oncogene* 14(11): 1361-1370.
- Maringhini, A., Thiruvengadam, R., Melton, L. J., Hench, V. S., Zinsmeister, A. R., DiMagno, E. P. 1987. Pancreatic cancer risk following gastric surgery. *Cancer* 60: 245-247.
- McDermott, R. P. and Kramer, P. 1973. Adenocarcinoma of the pancreas in four sibilings. *Gastroenterology* 65: 137-139.
- McKusick, V. A. 1990. Ataxia teleangiectatica. In: McKusick MA (ed) Mendelian inheritance in man, 9th edn. John Hopkins University Press, Baltimore, p68.
- Meier, P., Finch, A., Evan, G. 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801.
- Merlo, A., Herman, J. G., Mao, L., Lee, D. J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S. B., Sidransky, D. 1995. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1(7): 686-692.
- Monzon, J., Liu, L., Brill, H., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., From, L., McLaughlin, J., Hogg, D., Lassam, N. J. 1998. CDKN2a mutations in multiple primary melanomas. *N. Engl. J. Med.* 338: 879-887.
- Moskaluk, C. A., Hruban, R. H., Lietman, A., Smyrk, T., Fusaro, L., Fusaro, R., Lynch, J., Yeo, C. J., Jackson, C. E., Lynch, H. T., Kern, S. E. 1997. Novel germline p16INK4a allele (Asp145Cys) in family with multiple pancreatic carcinomas. *Hum Mutation* 12: 70.

Moskaluk, C. A., Hruban, R. H., Schutte, M., Lietman, A., Smyrk, T., Fusaro, L., Fusaro, R., Lynch, J., Yeo, C. J., Jackson, C. E., Lynch, H. T., Kern, S. E. 1997. Genomic sequencing of DPC4 in the analysis of familial pancreatic carcinoma. *Diag Mol Pathol* 6: 85-90.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51: 263-273.

Naumann, M., Savitskaia, N., Eilert, C., Schramm, A., Kalthoff, H., Schmiegeler, W. 1996. Frequent codeletion of p16/MTS1 and p15/MTS2 and genetic alterations in pancreatic tumors. *Gastroenterology* 110: 1215-1224.

New York Times. 1989. Gloria Carter Spann, President Carters last surviving sib, also suffers from pancreatic cancer. *New York Times* 1. Dezember 1989.

Nobori, T., Miura, K., Wu, D. J., Lois, A., Takabayashi, K., Carson, D. A. 1994. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368: 753-756.

Norell, S. E., Ahlbom, A., Erwald, R., Jacobson, G., Lindberg-Navier, I., Olin, R., Tornberg, B., Wiechel, K. L. 1986. Diet and pancreatic cancer: a case control study. *Am. J. Epidemiol.* 124: 894-902.

Nowell, P. C. und Hungerford, D. A. 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497.

Offerhaus, J. G. A., Giardello, F. M., Moore, G. W., Tersemette, A. C. 1987. Partial gastrectomy: a risk factor for carcinoma of the pancreas? *Hum. Pathol.* 18: 285.

Offerhaus, G. J., Giardiello, F. M., Krush, A. J., Booker, S. V., Tersmette, A. C., Kelley, N. C., Hamilton, S. R. 1992. The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 102(6): 1980-1982.

Ortega, S., Malumbres, M., Barbacid, M. 2002. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602(1): 73-87.

Peltomäki, P., Gao, X., Mecklin, J. P. 2001. Genotype and phenotype in hereditary nonpolyposis colon cancer: a study of families with different vs. shared predisposing mutations. *Familial Cancer* 1: 9-15.

Platz, A., Ringborg, U., Lagerlof, B., Lundqvist, E., Seigny, P., Inganas, M. 1996. Mutational analysis of the CDKN2 gene in metastases from patients with cutaneous malignant melanoma. *Br. J. Cancer* 73: 344-348.

Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83: 993-1000.

Reimer, R. R., Fraumeni, J. F., Ozols, R. F., Bender, R. 1977. Pancreatic cancer in father and son. *Lancet* 1: 911-912.

Rieder, H., Sina-Frey, M., Ziegler, A., Hahn, S. A., Przypadlo, E., Kress, R., Gerdes, B., Colombo Benkmann, M., Eberl, T., Grützmann, R., Lörken, M., Schmidt, J., Bartsch, D. K. 2002. German National Case Collection of Familial Pancreatic Cancer – Clinical-Genetic Analysis of the First 21 Families. *Onkologie* 25: 262-266.

Rieder, H., Ziegler, A., Hahn, S. A., Rothmund, M., Rehder, H., Schäfer, H., Schmiegell, W., Bartsch, D. K. 2002. Das familiäre Pankreaskarzinom: Klinische Manifestation, genetische Grundlagen und Möglichkeiten der Früherkennung. *Deutsches Ärzteblatt* 99.

Riley, D. J., Lee, E. Y., Lee, W. H. 1994. The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu Rev Cell Biol.* 10: 1-29.

Robertson, K. D. and Jones, P. A. 1999. Tissue-specific alternative splicing in the human INK4a/ARF cell cycle regulatory locus. *Oncogene* 18(26): 3810-3820.

Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S. A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S. N., Sohn, T. A., Hruban, R. H., Yeo, C. J., Kern, S. E. 1997. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57(9): 1731-1734.

Ruas, M. and Peters, G. 1998. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim. Biophys. Acta* 1378: F115-77.

Rulyak, S. J. and Brentnall, T. A. 2001. Inherited pancreatic cancer: surveillance and treatment strategies for affected families. *Pancreatology* 1(5): 477-485. Review.

Rulyak, S. J., Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., Brentnall, T. A. 2003. Risk factors for the development of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Gastroenterology* 124: 1292-1299.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 29; 239(4839): 487-491.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Schneider, G., Lersch, C., und Schmid, R. M. 2003. Karzinogenese des Pankreaskarzinoms. *Der Chirurg* 74: 165-170.

Schutte, M., Hruban, R. H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S. K., Moskaluk, C. A., Hahn, S. A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegell, W., Baylin, S. B., Kern, S. E., Herman, J. G. 1997. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 57(15): 3126-3130.

Serrano, M., Hannon, G. J., Beach, D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366(6456): 704-707.

Serrano, M., Lee, H. W., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., DePinho, R. A. 1996. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85: 27-37.

Sidransky, D. 1996. Is human patched the gatekeeper of common skin cancers? *Nat. Gen.* 14: 7-8.

Silverman, D. T., Schiffman, M., Everhart, J., Goldstein, A., Lillemoe, K. D., Swanson, G. M., Schwartz, A. G., Brown, L. M., Greenberg, R. S., Schoenberg, J. B., Pottern, L. M., Hoover, R. N., Fraumeni, J. F. Jr. 1999. Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 80: 1830-1837.

Srivastava, S., Zou, Z. Q., Pirollo, K., Blattner, W., Chang, E. H. 1990. Germline transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348: 747-749.

Su, G. H., Hruban, R. H., Bansal, R. K., Bova, G. S., Tang, D. J., Shekher, M. C., Westerman, A. M., Entius, M. M., Goggins, M., Yeo, C. J., Kern, S. E. 1999. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am. J. Pathol.* 154: 1835-1840.

Tanaka, H., Shimada, Y., Imamura, M., Shibagaki, I., Ishizaki, K. 1997. Multiple types of aberrations in the p16 (INK4a) and the p15(INK4b) genes in 30 esophageal squamous-cell-carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 70(4): 437-442.

Terhune, P. G., Phifer, D. M., Tosteson, T. D., Longnecker, D. S. 1998. K-ras mutation in focal proliferative lesions of human pancreas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 515-521.

Tersmette, A. C., Petersen, G. M., Offerhaus, G. J., Falatko, F. C., Brune, K. A., Goggins, M., Rozenblum, E., Wilentz, R. E., Yeo, C. J., Cameron, J. L., Kern, S. E., Hruban, R. H. 2001. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 7: 738-744.

Tulinius, H., Olafsdottir, G. H., Sigvaldason, H., Tryggvadottir, L., Bjarnadottir, K. 1994. Neoplastic diseases in families of breast cancer patients. *J. Med. Genet.* 31: 618-621.

Vasen, H. F. A., Gruis, N. A., Frants, R. R., Der Velden, P. A., Hille, E. T., Bergman, W. 2000. Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int. J. Cancer* 87: 809-811.

Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9: 138-141.

Weinberg, R. A. 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49 (14): 3713-3721. Review.

Weinberg, R. A. 1991. Tumor suppressor genes. *Science* 254 (5035): 1138-1146. Review.

Wenger, F. A., Peter, F., Zieren, J., Steiert, A., Jacobi, C. A., Muller, J. M. 2000. Prognosis factors in carcinoma of the head of the pancreas. *Dig Surg* 17: 29-35.

Whelan, A. J., Bartsch, D., Goodfellow, P. J. 1995. Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med.* 333: 975-977.

Whelan, A. J., Bartsch, D., Goodfellow, P. J. 1996. Letter to the Editor. *N Engl J Med* 334: 472.

Whitcomb, D. C., Gorry, M. C., Preston, R. A., Furey, W., Sossenheimer, M. J., Ulrich, C. D., Martin, S. P., Gates, L. K. Jr., Amann, S. T., Toskes, P. P., Liddle, R., McGrath, K., Uomo, G., Post, J. C., Ehrlich, G. D. 1996. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat. Genet.* 14: 141-145.

Wideroff, L., Gridley, G., Møller, L., Chow, W. H., Linet, M., Kjørtner, S., Borch-Johnsen, K., Olsen, J. H. 1997. Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 1360-1365.

Wilentz, R. E., Iacobuzio-Donahue, C. A., Argani, P., McCarthy, D. M., Parsons, J. L., Yeo, C. J., Kern, S. E., Hruban, R. H. 2000. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 60: 2002-2006.

Witkowski, J. A., 1990. The inherited character of cancer – an historical survey. *Cancer Cells* 2: 229-257.

Wong, T., Howes, N., Threadgold, J., Smart, H. L., Lombard, M. G., Gilmore, I., Sutton, R., Greenhalf, W., Ellis, I., Neoptolemos, J. P. 2001. Molecular diagnosis of early pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk patients. *Pancreatology* 1(5): 486-509. Review.

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., Micklem, G. 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* Dec 21-28; 378 (6559): 789-792.

Yeo, C. J. and Cameron, J. L. 1998. Prognostic factors in ductal pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg* 383: 129-133.

Zhang, Y., Xiong, Y., Yarbrough, W. G. 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92: 725-734.

Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Walker, G. J., Hayward, N., Dracopoli, N. C. 1996. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 12: 97-99.

Sonja Freyermuth

Götzenhainer Weg 2, 63303 Dreieich; 06103-6920954; S.Freyermuth@gmx.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum	22.11.1977
Geburtsort	Frankfurt am Main
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schul Ausbildung

Juni 1997	Abitur
1988-1997	Gesamtschule Weibelfeld, Dreieich
1984-1988	Ludwig-Erk-Grundschule, Dreieich

Berufsausbildung

August 2000	Krankenpflegeexamen
1997-2000	Krankenpflegeausbildung im Krankenhaus Sachsenhausen, Frankfurt am Main

Hochschulstudium

November 2007	3. Staatsexamen an der J. W. von Goethe-Universität, Frankfurt am Main
April 2006	2. Staatsexamen an der Philipps-Universität, Marburg
August 2003	1. Staatsexamen an der Philipps-Universität, Marburg
August 2002	Physikum an der Philipps-Universität, Marburg
Oktober 2000	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität, Marburg

Famulaturen

August 2005	Plastischen Chirurgie, Wiederherstellungs- und Handchirurgie am Markus-Krankenhaus, Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. med. K. Exner, Frankfurt am Main
Februar/März 2005	Pädiatrie/Gynäkologie am Victoria Hospital, Mahe (Seychellen)
September 2004	Dermatologische Praxis Dr. Tourbier, Langen
Februar/März 2003	Chirurgie am Krankenhaus Sachsenhausen, Chefarzt: Prof. Dr. med. R. Weiner, Frankfurt am Main

Praktisches Jahr

Juni 2007 – September 2007	Innere Medizin mit Rotation in Medizinischer Notaufnahme, Hämatologie/Onkologie und Nephrologie an der Uniklinik Frankfurt am Main
Februar 2007 – Juni 2007	Gynäkologie und Geburtshilfe an der Uniklinik Frankfurt am Main
Oktober 2006 – Februar 2007	Chirurgie mit Rotation in Herzchirurgie, Allgemeinchirurgie und Unfallchirurgie an der Uniklinik Frankfurt am Main

Tätigkeiten neben dem Studium

Juni 2004 – Dezember 2005	Ambulanter Hilfsdienst in dem Verein zur Förderung der Integration Behinderter e.V., Marburg
Juli 2001 – Februar 2004	Häusliche Krankenpflege Vera Zoll-Buhles, Dreieich

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren in Marburg:

PROF. DR.	Aumüller	Institut für Anatomie und Zellbiologie
PROF. DR.	Barth	Institut für Pathologie
PD DR.	Bartsch	Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
PROF. DR. DR.	Basler	Institut für Medizinische Psychologie
PROF. DR.	Baum	Abteilung für Allgemeinmedizin, Präventive und Rehabilitative Medizin
PROF. DR.	Czubayko	Institut für Pharmakologie und Toxikologie
PROF. DR.	Daut	Institut für Physiologie und Pathophysiologie
PROF. DR.	Grzeschik	Zentrum für Humangenetik, Allgemeine Humangenetik
PROF. DR.	Hertl	Klinik für Dermatologie und Allergologie
PROF. DR.	Klose	Klinik für Strahlendiagnostik
PROF. DR.	Koolmann	Institut für Physiologische Chemie
PROF. DR.	Lohoff	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
PROF. DR.	Maisch	Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie
PROF. DR. DR.	Mandrek	Institut für Physiologie
PROF. DR.	Moll	Institut für Pathologie
PROF. DR. DR.	Mueller	Institut für Medizinische Soziologie und Sozialmedizin
PROF. DR.	Oertel	Klinik für Neurologie
PROF. DR.	Remschmidt	Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und – psychotherapie
PROF. DR.	Rieder	Medizinisches Zentrum für Humangenetik
PROF. DR.	Röhm	Institut für Physiologische Chemie
PROF. DR.	Suske	Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
PROF. DR.	Steiniger	Institut für Anatomie und Zellbiologie
PROF. DR.	Wagner	Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie und Onkologie
PROF. DR.	Weihe	Institut für Anatomie und Zellbiologie
PROF. DR.	Werner	Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rieder möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seinem Labor und für die Überlassung des interessanten Themas danken.

Bei Frau Dr. Stephanie Schneider möchte ich mich für ihre Unterstützung während meiner Zeit im Labor und auch danach ganz besonders herzlich bedanken.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Zytogenetik des Humangenetischen Instituts der Philipps-Universität Marburg bedanken, die mir mit Rat und Tat beim anfertigen dieser Arbeit geholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie Nicolas Zander, meiner Tochter Emely, meinen Eltern Maria und Gerhard Freyermuth und meinem Bruder Thomas Freyermuth die mich sehr unterstützt haben und immer für mich da sind.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel Untersuchungen zu Sequenzvarianten im p12-Gen beim hereditären Pankreaskarzinom im Medizinischen Zentrum für Humangenetik unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Grzeschik mit Unterstützung durch Prof. Dr. Harald Rieder ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 26.02.2009

Sonja Freyermuth

